UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
CENTRO DE PESQUISA EM VIROLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE MUTAÇÕES NA SEQUÊNCIA
DE NUCLEOTÍDEOS DO DOMÍNIO HOMO B DO GENE DA
ENDOPROTEASE FURINA**

Flávia Masson de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Ribeirão Preto

2016

FLÁVIA MASSON DE MORAES

Análise da presença de mutações na sequência de nucleotídeos do
domínio homo B do gene da endoprotease furina

Dissertação de mestrado a ser apresentada ao
curso de Pós-Graduação em Clínica Médica –
Investigação Biomédica da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de
São Paulo, para a obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Ribeirão Preto

2016

MORAES, F.M.	Análise da presença de mutações na sequência de nucleotídeos do domínio homo B do gene da endoprotease furina		Mestrado FMRP-USP 2016
--------------	--	--	------------------------------

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Moraes, Flávia Masson de

Análise da presença de mutações na sequência de nucleotídeos do domínio homo B do gene da endoprotease furina/ Flávia Masson de Moraes; orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca – Ribeirão Preto, 2016.

54p: il; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica – Investigação Biomédica, 2016.

1. Furina 2. Mutação 3. Dengue 4. HRM

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Flávia Masson de Moraes

Título: Análise da presença de mutações na sequência de nucleotídeos do domínio homo B do gene da endoprotease furina

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica – Investigação Biomédica.

Apresentada em __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e à toda a minha família por me incentivarem a sempre seguir os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao professor Dr. Benedito por me acompanhar desde o começo da minha carreira científica, por me orientar e por permitir que eu faça parte do seu grupo de pesquisa.

Agradeço a todos os professores componentes da banca examinadora. Obrigada pela disponibilidade e pelo tempo dedicado à leitura e discussão desse trabalho.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Clínica Médica, principalmente ao Emerson, por sempre tirar as minhas dúvidas e por me lembrar dos prazos.

Agradeço à CAPES pela bolsa e pelo financiamento desse projeto.

Agradeço aos funcionários, companheiros e amigos do Centro de Pesquisa em Virologia por todo aprendizado, pelas conversas, pelos almoços, cafés da tarde e pelas risadas diárias, especialmente aos amigos de laboratório Danillo, Taline, Beatriz, Michelli, Marcela e Jonathan, e também aos amigos que não estão mais com a gente Emiliana, Fernanda, Ana Luísa e Flávio.

Agradeço especialmente à Dra. Emiliania Abrão, que além de ser uma grande amiga é também uma grande orientadora, confidente e conselheira. Obrigada por sempre estar ali.

Agradeço à Dra. Miriã pela ajuda e por me ensinar a utilizar as ferramentas necessárias à análise dos sequenciamentos.

Agradeço imensamente aos meus pais por serem tão maravilhosos para mim e por me ensinarem que a educação é a melhor herança que alguém pode ter. Agradeço aos meus irmãos, avós e tios, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

Agradeço ao meu namorado Wendell, quem nunca duvidou que eu conseguiria chegar até aqui. Obrigada por me ouvir, me apoiar e me fazer sorrir todos os dias.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a ficar mais perto de realizar os meus sonhos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

MORAES, F. M. **Análise da presença de mutações na sequência de nucleotídeos do domínio homo B do gene da endoprotease furina.** 2016. 54f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Os vírus dengue (DENV) são os principais arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes) circulantes no Brasil e são transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, causando a doença denominada dengue. Atualmente, a dengue é a arbovirose humana de maior significância em saúde pública, existindo quatro diferentes sorotipos: DENV- 1 a 4. Embora grande parte das infecções por dengue seja assintomática ou resultem em sintomas mais brandos, o número de pacientes com complicações ou com uma forma mais grave da doença tem aumentado significativamente a cada ano. Sabe-se que a presença de mutações no gene que codifica a endoprotease furina, produzida em uma grande diversidade de células humanas e essencial no processo de maturação dos vírus dengue nas células infectadas, levam à perda da atividade catalítica dessa proteína e, conseqüentemente, à deficiência na maturação viral. Esse trabalho teve como objetivo analisar a presença de mutações no domínio homo B da furina e verificar se a gravidade da doença está ou não relacionada a elas. Para isso, 245 amostras de DNA, incluindo amostras de pacientes com dengue, dengue grave e controles, foram submetidas à reação de PCR em Tempo Real, análise por *High Resolution Melting* (HRM) e aquelas que apresentaram mutação, segundo esse método, foram sequenciadas. Os resultados mostraram que todas as amostras classificadas, por HRM, como diferentes variantes não apresentavam qualquer mutação por sequenciamento, o que pode ser devido à qualidade das amostras e à concentração de sal, já que esses são fatores determinantes para a eficiência do HRM. Como as amostras dos grupos dengue e dengue grave também foram sequenciadas e verificou-se que também não há mutações nas sequências dessas amostras, concluímos que a gravidade da dengue não está relacionada com a presença de mutações no domínio homo B da endoprotease furina.

Palavras Chaves: Furina, Dengue, mutação, HRM

ABSTRACT

MORAES, F. M. **Analysis of the presence of mutations in homo B nucleotide sequence of endoprotease furin gene.** 2016. 54f. Dissertation (Master). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Dengue viruses (DENV) are the main arboviruses (virus transmitted by arthropods) that circulate in Brazil and are transmitted by *Aedes* mosquitoes, causing dengue disease. Nowadays, dengue is the most important arbovirolosis that affects humans and it is an important disease to public health. There are four dengue serotypes (DENV- 1 a 4) and, although the majority of dengue infections remain asymptomatic or cause milder symptoms, the number of patients with complications has increased year by year. It is known that the presence of mutations in furin gene, which is an important endoprotease produced in a high diversity of human's cells and is essential for dengue virus maturation, cause the loss of its catalytic activity and, consequently, leads to virus maturation deficiency. This work aimed the analysis of the presence of mutations in furin homo B domain and the verification if dengue severity is related or not with them. Thus, 245 DNA samples, including patient's samples with dengue, severe dengue and control group, were amplified by Real Time PCR, analyzed by High Resolution Melting (HRM) and those with any mutation, using this method, were sequenced. The results have showed that all samples classified as different variants by HRM did not presented any mutation by sequencing, what might be due to samples quality and salt concentration, since these are determinant factors for HRM efficiency. Dengue and severe dengue samples were sequenced as well and no mutations were found. In conclusion, dengue severity is not related to the presence of mutations in homo B domain.

Key words: Furin, Dengue, mutation, HRM

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*.** (Adaptado de Barros, 2007).10
- Figura 2. Proteínas do vírus da dengue através da membrana do retículo endoplasmático.** As setas indicam locais que sofrem clivagem por proteases (Adaptado de Li *et al*, 2008).11
- Figura 3. Ciclo replicativo dos vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*.** Fonte: Pierson and Diamond, 2012.12
- Figura 4. Via de ativação da endoprotease furina.** A furina madura e as porções do propeptídeo estão mostradas em rosa e preto, respectivamente. A primeira clivagem, RAKR (Arg-Ala-Lys-Arg), na região C-terminal do propeptídeo, e a segunda clivagem, RGVTKR (Arg-Gly-Val-Thr-Lys-Arg), no interior do propeptídeo, estão representadas. Modificado de Nakayama, 1997.14
- Figura 5. Gene da endoprotease furina.** A região de clivagem RAKR, os resíduos catalíticos Asp, His, Ser e Asn (Asp) (D, H, N e S, respectivamente), bem como a sequência Arg-Gly-Asp (Ser) (RGD), são mostrados. Modificado de Nakayama, 1997.15
- Figura 6. Curvas de melting mostrando a diferença entre as curvas do homozigoto, heterozigoto e selvagem.** Vermelho: homozigoto com guanina, verde: homozigoto com adenina, azul: heterozigoto. Modificado de *A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis, Applied Biosystems*.20
- Figura 7. Gel de eletroforese mostrando parte da região do domínio homo B amplificada sob a temperatura de 60°C.** A. Na ordem: marcador de 1 kb, controle negativo (neg) e amostra de DNA. B. Na ordem: marcador de 1 kb e algumas amostras de DNA de diferentes pacientes.26
- Figura 8. Gel de eletroforese mostrando o fragmento de 150 pb obtido após a realização de uma segunda PCR convencional.** Na ordem: marcador de 100 pb, controle negativo (neg) e amostras de DNA purificado de diferentes pacientes.27
- Figura 9. Amostras dos grupos “Dengue” e “Dengue grave” analisadas por HRM.** A. *Aligned melt curves*. B. *Derivative melt curves*.28
- Figura 10. Amostras do grupo “Controle” analisadas por HRM.** A. *Aligned melt curves*. B. *Derivative melt curves*.29
- Figura 11. Alinhamento das amostras do grupo “Controle” com a sequência de RNA mensageiro da furina.** Destaque da sequência de nucleotídeos referente aos aminoácidos “RGD”.30

Figura 12. Cromatograma mostrando as inserções detectadas pelo sequenciamento. As setas indicam o pico referente à cada inserção. Azul: inserção do nucleotídeo G. Rosa: inserção do nucleotídeo A. Verde: inserção do nucleotídeo C.....31

Figura 13. Alinhamento das amostras dos grupos “Dengue” e “Dengue grave” com a sequência de RNA mensageiro da furina. Destaque da sequência de nucleotídeos referente aos aminoácidos “RGD”.....32

Figura 14. Sequências destacadas referentes ao aminoácido triptofano (Trp). A. Amostras do grupo “Controle”. B. Amostras dos grupos “Dengue” e “Dengue grave”.33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos *primers* desenhados.....23

Tabela 2. Valor do Silhouette Score das amostras classificadas como mutantes pelo HRM. Em vermelho estão as amostras que obtiveram valor menor que 0.8. ...34

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

ADE – *Antibody Dependent Enhancement*

BRAF - Proto-oncogene B-Raf

C – Proteína do capsídeo

DC – Dengue clássica

DC-SIGN – *Dendritic cell-specific*

DENV – Dengue vírus

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E – Proteína do envelope

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Fc – *Crystal Fraction*

FHD – Febre hemorrágica da dengue

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HCl – Ácido Clorídrico

HCRP – Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

HRM – *High Resolution Melting*

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

LoVo – Células de adenocarcinoma humano

M – Proteína de membrana

NS – Proteína não-estrutural

PC – Proteína convertase

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

prM – Proteína precursora da membrana

RNA – Ácido Ribonucleico

SCD – Síndrome do choque da dengue

UE – Unidade de Emergência

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Epidemiologia	9
1.2. Vírus: estrutura e patogenia	9
1.2.1. Endoprotease furina	13
1.3. Manifestações clínicas	15
1.3.1. Dengue	15
1.3.2. Dengue com sinais de alarme	15
1.3.3. Dengue grave	16
1.4. Diagnóstico, tratamento e prevenção	16
1.5. <i>High Resolution Melting</i> (HRM)	18
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Casuística	23
4.2. Extração do DNA	23
4.3. Desenho dos <i>primers</i>	23
4.4. Amplificação do domínio homo B por PCR em Tempo Real	24
4.4.1. Padronização da reação por PCR convencional	24
4.4.2. Purificação do DNA a partir do gel de agarose	24
4.4.3. Padronização da reação de PCR em Tempo Real	24
4.4.4. Análise por <i>High Resolution Melting</i> (HRM)	24
4.5. Reação de sequenciamento do DNA	25
4.5.1. Precipitação das amostras	25
4.6. Análise das sequências genômicas	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Padronização da reação por PCR convencional	26

5.2.	Purificação do DNA a partir do gel de agarose	26
5.3.	PCR em Tempo Real e análise por HRM.....	27
5.4.	Sequenciamento das amostras selecionadas por HRM	30
5.4.1.	Sequenciamento das amostras dos grupos “Dengue” e “Dengue grave”	31
5.4.2.	Análise de outras mutações por sequenciamento	32
5.5.	Análise da qualidade da genotipagem pelo valor do <i>Silhouette Score</i>	34
6.	DISCUSSÃO	36
7.	CONCLUSÃO	40
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

A dengue é uma importante arbovirose que tem altos índices de morbidade e mortalidade na grande maioria dos países tropicais e subtropicais (Cansanção *et al*, 2015; Halstead, 1997), uma vez que o meio ambiente dessas regiões favorece o desenvolvimento e a proliferação do seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti* (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2005).

Nos últimos 50 anos, a incidência da doença aumentou em 30 vezes, havendo uma expansão das áreas afetadas. Estima-se que 290 milhões de infecções ocorram anualmente, sendo as Américas e a Ásia áreas altamente endêmicas (Bhatt *et al*, 2013). Embora grande parte das infecções por dengue seja assintomática ou resultem apenas em doença febril de gravidade leve a moderada, o número de pacientes com complicações ou com uma forma mais grave da doença tem aumentado significativamente a cada ano (Rodenhuis-Zybert, 2011).

Do início de janeiro ao final de abril de 2016 foram registrados 1.054.127 casos prováveis de dengue no país, com a região Sudeste dominando o número de casos prováveis (59,3%), seguida da região Nordeste (19,5%). Foram confirmados 340 casos de dengue grave, 3.626 casos de dengue com sinais de alarme e 190 óbitos por dengue. Ainda, o isolamento viral de 1.124 amostras mostrou que, até esse período, a maioria dos casos confirmados pertenciam ao sorotipo DENV-1 (Boletim epidemiológico – Guia de vigilância em saúde, 2016).

1.2. Vírus: estrutura e patogenia

A dengue é causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae. Esse gênero é composto por 53 espécies virais, sendo, em sua maioria, arbovírus, ou seja, após um ciclo replicativo no organismo do vetor, os vírus são transmitidos por artrópodes (Mackenzie, 2004). O genoma dos flavivírus consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 11 kb de extensão, traduzida em uma única poliproteína viral que é clivada, durante e após a tradução, por proteases de origem viral e também da célula hospedeira, como ilustrado na figura 1.

Figura 1. Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*. (Adaptado de Barros, 2007).

Após a clivagem da poliproteína, resultam 3 proteínas estruturais: a do capsídeo (C), que circunda o genoma do vírus, a precursora da membrana (prM) e a do envelope (E), sendo que as duas últimas encontram-se na bicamada lipídica do envelope viral (Kelly *et al*, 2000; Halstead, 2008), como pode ser visto na figura 2. Além delas, 7 proteínas não estruturais também são produzidas, sendo elas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5. As extremidades desse genoma possuem sequências curtas não codificadoras nas extremidades denominadas 3'-NC e 5'-NC e as sequências codificadoras são organizadas na seguinte ordem: 5'-C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3' (Gubler & Markoff, 2007).

Figura 2. Proteínas do vírus da dengue através da membrana do retículo endoplasmático. As setas indicam locais que sofrem clivagem por proteases (Adaptado de Li *et al*, 2008).

A figura 3 mostra o ciclo replicativo dos flavivírus. Após sua ligação à superfície celular, o vírus é endocitado e entregue a endossomos, cujo baixo pH gera uma mudança conformacional na glicoproteína E, o que permite a fusão do vírus com a membrana celular do endossomo e a liberação dos componentes virais no citoplasma celular (Henchal & Putnak, 1990; Rey, 2003). Já a proteína prM é clivada em proteína de Membrana (M) por uma furino-protease, o que a torna madura e permite que as porções da proteína E que se projetam do vírus fiquem evidenciadas, ocorrendo a saída do vírus por exocitose (Modis *et al*, 2003). Tal clivagem da prM é de grande importância para a infectividade viral, pois partículas imaturas não se fundem com as membranas celulares e, conseqüentemente, não há liberação dos componentes virais (Henchal & Putnak, 1990).

Figura 3. Ciclo replicativo dos vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*. Fonte: Pierson and Diamond, 2012.

São conhecidos quatro sorotipos dos vírus dengue, que apresentam características antigênicas distintas: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Tauil, 2001). Tais sorotipos distinguem-se por anticorpos neutralizantes produzidos pelo organismo em resposta à infecção (Stephenson, 2005). Sabe-se que a resposta imune contra a infecção pelos vírus da dengue atua, principalmente, contra as proteínas prM e E. Porém, muitos estudos mostram que essa resposta nas infecções primárias e secundárias é predominantemente contra a proteína E (Rodenhuis-Zybert *et al*, 2011). Essa proteína é de grande importância, pois além de induzir a resposta imune do hospedeiro, ela medeia a entrada do vírus na célula. Vários candidatos tem sido sugeridos como receptores primários para o vírus, como as moléculas DC-SIGN, heparan sulfato e o receptor de manose (Chen *et al* 1997; Miller *et al* 2008; Tassaneetrithep *et al* 2003).

As proteínas E e prM (M) podem neutralizar completamente o mesmo sorotipo ou aumentar a entrada de partículas virais nas células na infecção por um sorotipo

diferente, pelo processo denominado *Antibody Dependent Enhancement of Infection* (ADE) (Halstead, 2008; Rodenhuis-Zybert, 2011). Neste fenômeno, os vírus, utilizando-se de anticorpos pré-existentes e sub-neutralizantes produzidos por uma infecção anterior, ligam-se às células alvo portadoras de receptores Fc, aumentando a sua capacidade de infecção por meio de rota natural receptor-ligante. Dessa maneira, a quantidade de vírus torna-se exacerbada, assim como a gravidade da doença (Halstead, 2008; Rodenhuis-Zybert *et al*, 2011; Tirado & Yoon, 2003).

Rodenhuis-Zybert e colaboradores (Rodenhuis-Zybert *et al*, 2010) mostraram que partículas de DENV imaturas tornam-se infecciosas na presença de anticorpos anti-prM. Durante a infecção primária, ou seja, quando não há anticorpos contra os antígenos virais, as partículas imaturas não conseguem infectar as células do hospedeiro. Porém, numa infecção secundária, agora com anticorpos contra o vírus, incluindo anti-prM, tais partículas imaturas podem se tornar altamente infecciosas, uma vez que a associação destas com anticorpos anti-prM facilita a infecção por meio da ligação FcγII-receptor e aumenta o título de vírus circulante no hospedeiro, podendo levar ao aparecimento de dengue grave.

Ainda, Rodenhuis-Zybert e colaboradores (Rodenhuis-Zybert *et al*, 2010) mostraram que a furina tem papel essencial nesse processo. As partículas imaturas na presença de anticorpos anti-prM e ausência de furina ativa não são infecciosas, mas quando na presença dessa endoprotease, o processamento da prM em proteína de membrana faz com que as partículas tornem-se altamente infecciosas. Isso evidencia a importância da furina, uma vez que numa condição em que ela perde sua função, devido à alguma mutação por exemplo, mesmo que se tenham partículas imaturas associadas a anticorpos de uma infecção primária, essas partículas não iriam infectar as células do hospedeiro, o que reduziria a chance de desenvolver dengue grave.

1.2.1. Endoprotease furina

A proteína glicosilada prM é encontrada como um heterodímero com a proteína E em partículas imaturas do vírus e pode atuar como uma chaperona para o dobramento correto da proteína E, além de prevenir a degradação dessa proteína durante o seu processamento pós-traducional. Ao final da via trans-Golgi, a prM é clivada, em pH baixo, pela furina, uma endoprotease do hospedeiro, resultando na

proteína M, não-glicosilada, permitindo assim uma mudança conformacional no heterodímero proteína E/prM, o que torna a partícula viral madura e expõe a proteína E, possibilitando assim, a saída de partículas virais infecciosas (Halstead, 2003).

A figura 4 ilustra a via de ativação da furina. Antes de tornar-se ativa, essa endoprotease sofre um processo de clivagem autocatalítica no interior do retículo endoplasmático, por meio do qual ocorre a clivagem do propeptídeo na região Arg-Ala-Lys-Arg (RAKR) dessa proteína. Esse fenômeno é essencial para que se tenha a saída da furina do retículo endoplasmático (Anderson *et al*, 2002). Ao atingir a região trans-Golgi, ambiente ácido e rico em íons de cálcio, o propeptídeo, que permanece associado à furina apesar de ter sido clivado, sofre uma segunda clivagem, agora na região Arg-Gly-Val-Thr-Lys-Arg (RGVTKR), e é liberado, o que torna a furina biologicamente ativa (Nakayama, 1997).

Figura 4. Via de ativação da endoprotease furina. A furina madura e as porções do propeptídeo estão mostradas em rosa e preto, respectivamente. A primeira clivagem, RAKR (Arg-Ala-Lys-Arg), na região C-terminal do propeptídeo, e a segunda clivagem, RGVTKR (Arg-Gly-Val-Thr-Lys-Arg), no interior do propeptídeo, estão representadas. Modificado de Nakayama, 1997.

O gene que codifica essa endoprotease está localizado no cromossomo 15q26.1 (Lei *et al*, 2009). Tal gene, representado na figura 5, apresenta um domínio chamado “homo B”, o qual é essencial para a atividade endoproteolítica da furina, assim como o domínio catalítico (Takahashi *et al*, 1995). No interior desse domínio, existe uma sequência conservada entre as convertases da família das *proprotein convertases*, da qual a furina faz parte. Tal sequência é constituída por três aminoácidos: Arg-Gly-Asp (RGD) (Nakayama, 1997). Lusson e colaboradores (1997) mostraram que mutações nessa sequência em PC1/PC3, convertases pertencentes à mesma família da furina, levam à perda da sua atividade catalítica.

Figura 5. Gene da endoprotease furina. A região de clivagem RAKR, os resíduos catalíticos Asp, His, Ser e Asn (Asp) (D, H, N e S, respectivamente), bem como a sequência Arg-Gly-Asp (Ser) (RGD), são mostrados. Modificado de Nakayama, 1997.

1.3. Manifestações clínicas

Até o final do ano de 2009, a classificação vigente das manifestações clínicas da dengue era aquela proposta pela Organização Mundial da Saúde, segundo a qual essa doença poderia ser classificada como dengue clássica (DC) e febre hemorrágica da dengue (FHD), sendo que esta última poderia apresentar quatro graus (I, II, III e IV), com FHD III e IV compreendendo a síndrome do choque da dengue (SCD) (WHO, 2005). Entretanto, desde janeiro de 2014 a nova classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde entrou em vigor no Brasil. Segundo ela, a dengue passou a ter três classificações: dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Essa nova denominação mostrou-se mais sensível para captar os casos graves e, dessa maneira, deverá contribuir para melhorar o diagnóstico e reduzir a letalidade por dengue (Informe Semanal Dengue - Governo do Estado do Ceará, Secretaria da Saúde, 2013).

1.3.1. Dengue

Casos suspeitos de dengue devem ser considerados em pessoas que vivem em locais endêmicos ou que viajaram para algum desses locais, além da presença de febre e de pelo menos dois dos sintomas a seguir: náusea, vômito, manchas vermelhas na pele, leucopenia, dor nas articulações e “prova do laço” positiva (WHO, 2009).

1.3.2. Dengue com sinais de alarme

Manifestações clínicas como as mostradas no tópico 1.3.1. somadas a um ou mais dos sintomas a seguir levam à suspeita de dengue com sinais de alarme: dor

abdominal, vômitos persistentes, sangramento das mucosas, acumulação de fluidos, letargia e aumento do fígado. O aumento do nível do hematócrito concomitante com a diminuição de plaquetas também é considerado um sinal de alarme (WHO, 2009).

1.3.3. Dengue grave

A dengue grave deve ser considerada em pessoas de áreas endêmicas com febre de 2 a 7 dias somada a algum dos seguintes sintomas: evidência de vazamento de plasma, sangramento, níveis alterados de consciência, envolvimento gastrointestinal grave e acometimento de órgãos (WHO, 2009).

1.4. Diagnóstico, tratamento e prevenção

O método padrão para o diagnóstico laboratorial da dengue é o isolamento viral, existindo quatro formas de realização desse procedimento: inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos, inoculação intratorácica em mosquitos adultos, cultura de células de mamíferos e cultura de células de mosquito. Porém, por ser uma técnica que demanda tempo, de 7-14 dias, ela acaba não sendo a mais recomendada para uso em laboratórios de rotina (Guzmán & Kourí, 1996; Gubler, 1998). Por isso, outras formas de diagnóstico da dengue são mais utilizadas, sendo elas a detecção de anticorpos no soro de pacientes e a detecção de antígenos virais ou de seu genoma (Halstead, 2008). Dentre os principais testes utilizados, merece destaque o imunoensaio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), por meio do qual é possível diferenciar a infecção primária da infecção secundária, detectando-se diferentes níveis de anticorpos IgM e IgG, respectivamente.

Existem, também, testes rápidos (até 20 minutos) e de menor custo, como a imunocromatografia, que detectam a presença de antígenos ou anticorpos no soro de pacientes. No caso dos anticorpos, quando presentes, reagem com um antígeno comum a todos os sorotipos, presente em uma coluna fornecida pelo kit diagnóstico. Ainda, é possível detectar a proteína NS1 no soro de pacientes, por meio da reação desta com anticorpos IgM e IgG anti-NS1 presentes na coluna de imunocromatografia (Cardosa *et al*, 1988). Além disso, dentre os métodos moleculares para detecção do genoma viral, temos a reação em cadeia da polimerase (PCR) que também pode ser utilizada no diagnóstico da dengue, assim como a PCR em Tempo Real (Timerman *et*

al, 2012). Porém, as técnicas moleculares ainda são pouco utilizadas para investigação de casos suspeitos fora dos centros de pesquisa e universidades devido ao alto custo para o uso rotineiro nos serviços de saúde.

Com relação ao tratamento da doença, não existe nenhum medicamento que esteja relacionado com a eliminação do vírus do organismo do paciente. A atenção aos sintomas é a única forma de tratar o indivíduo doente, sendo a hidratação via oral ou venosa, a administração de antipiréticos e de analgésicos adequados as únicas formas de tratar o paciente e de evitar a piora do quadro. Além disso, é de extrema importância o monitoramento laboratorial por meio de exames de sangue daqueles pacientes com formas mais graves (WHO, 2009).

Já as vacinas têm recebido grande destaque para o combate de algumas doenças transmitidas por flavivírus como a febre amarela, a encefalite japonesa e a encefalite transmitida por carrapato. Entretanto, a elaboração de uma vacina contra a dengue ainda é um desafio (Stephenson, 2005). Isso se deve ao fato de a infecção com um dos sorotipos não provocar a imunidade contra os outros tipos, induzindo, apenas, a imunidade homóloga (Calvert *et al*, 2005). Assim sendo, é necessário que as possíveis vacinas contra a dengue sejam polivalentes, o que dificulta o seu desenvolvimento. Outro desafio está relacionado à ausência de modelos animais para se testar a efetividade das vacinas, uma vez que a doença não se manifesta de maneira semelhante em animais não humanos (Bricks, 2004). Além disso, o fenômeno do ADE também é uma dificuldade a ser enfrentada.

Apesar das dificuldades, diversas estratégias têm sido empregadas na tentativa de elaboração de uma vacina contra a dengue, como: as clássicas (vírus vivos atenuados em cultura de tecidos; partículas virais inativadas e vacinas de subunidades de proteínas ou peptídeos); as de tecnologia do DNA recombinante (vacinas quiméricas caracterizadas pela inserção de genes de um ou mais sorotipos do vírus da dengue no genoma de outros flavivírus ou em um sorotipo atenuado do vírus e uso de vetores capazes de expressar proteínas ou peptídeos), as vacinas de DNA e as mistas (associação de vírus vivos com proteínas ou partes do genoma viral) (Bricks, 2004). Dentre as técnicas existentes, a produção de vacinas que se utilizam de proteínas recombinantes mostra-se muito vantajosa, uma vez que o patógeno é excluído da vacina, o que elimina o risco de reversão ao genótipo virulento ou de inativação incompleta do organismo (Liljeqvist & Stahl, 1999).

Para que seja viável, a vacina deve proteger contra a infecção pelos quatro sorotipos virais e, nos países onde a dengue é endêmica, deve ser segura para uso em crianças entre 9-12 meses de idade, possuir baixo custo e ser capaz de induzir imunidade protetora a longo prazo (Heinz & Stiasny, 2012; Halstead & Deen, 2002). A ausência de uma vacina faz com que a única forma de se prevenir a dengue seja por meio da eliminação do vetor *Aedes aegypti*, o que é conseguido eliminando água parada de recipientes e cobrindo caixas d'água e piscinas, locais onde as larvas se desenvolvem.

Recentemente, a empresa farmacêutica *Sanofi Pasteur* desenvolveu uma vacina tetravalente contra a dengue, a qual se mostrou eficaz quando utilizada em três doses (0, 6 e 12 meses) (Capeding *et al*, 2014). A primeira campanha de vacinação começou no início de 2016 nas Filipinas, sendo vacina da *Sanofi Pasteur* a primeira a receber a aprovação para prevenção da dengue (Acesso online: www.es.dengue.info/).

1.5. High Resolution Melting (HRM)

O HRM é um método de análise pós-PCR utilizado para identificar variações genéticas nas sequências de ácidos nucleicos. Toda a análise se baseia na curva de *melting* (curva gerada por um gráfico de fluorescência liberada em função da temperatura), que é gerada após a PCR em Tempo Real quando se utiliza um fluoróforo intercalante de dupla fita (Taylor, 2009).

Inicialmente, a sequência de interesse é amplificada por PCR na presença de um fluoróforo saturante que se liga à dupla fita de DNA (Erali *et al*, 2008). Porém, na presença de alguma mutação na sequência de nucleotídeos, as moléculas do fluoróforo deixam o DNA no local onde há mutação, o que é visualizado por meio da diminuição do sinal de fluorescência, diferente do que ocorre com fluoróforos intercalantes não saturantes de dupla fita, que quando se deparam com uma mutação na sequência de DNA, não são liberados, havendo um rearranjo das moléculas desses fluoróforos na dupla fita de tal forma que não há mudança no sinal de fluorescência. Ao término da amplificação das sequências de interesse, a dupla fita do *amplicon* se dissocia gradativamente com o aumento da temperatura, gerando a curva de *melting* e, finalmente, a fluorescência emitida é medida no termociclador (*A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis, Applied Biosystems*).

Alguns fatores são determinantes para a realização da análise pós-PCR utilizando o HRM, sendo eles a qualidade da amostra, os *primers* utilizados na reação de PCR e o tamanho do *amplicon*. É importante que se tenha amostras com uma alta concentração de ácidos nucleicos, além de uma baixa concentração de sal, consequente da extração do material genético (*A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis, Applied Biosystems*).

Ainda, os *primers* utilizados precisam ser altamente específicos para a região de interesse, sem a formação de dímeros. Por isso, é muito importante padronizar a concentração de cada *primer* utilizado na reação (*HRM Experiments – User guide, Applied Biosystems*). Fragmentos com tamanho entre 100-300 pb tem sido utilizados para a detecção de mutações de maneira bem sucedida (Gundry *et al*, 2003). Foi observado que quanto maior o tamanho do *amplicon*, menor é a diferença entre as curvas de *melting* de uma amostra selvagem e de uma amostra heterozigota, o que dificulta a separação entre elas (Reed & Wittwer, 2004).

As curvas de *melting* geradas são diferenciadas de duas formas, como mostra a figura 6: a do homozigoto mutante, quando comparada com a amostra selvagem, tem a mesma forma da curva, mas diferente temperatura de *melting*. Já a do heterozigoto tem a forma da curva diferente quando comparado com a amostra selvagem (Taylor, 2009).

A confiabilidade no agrupamento correto das amostras e das curvas geradas é medida pelo *Silhouette Score*, que determina quão bem as amostras foram separadas entre os diferentes grupos (heterozigoto e homozigoto), sendo uma medida da qualidade da genotipagem. O valor ideal do *Silhouette Score* é entre 0.8 e 1.0 e esses valores são calculados e gerados pelo próprio software HRM (*A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis, Applied Biosystems*).

Figura 6. Curvas de melting mostrando a diferença entre as curvas do homozigoto, heterozigoto e selvagem. Vermelho: homozigoto com guanina, verde: homozigoto com adenina, azul: heterozigoto. Modificado de *A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis*, Applied Biosystems.

2. JUSTIFICATIVA

A furina é uma endoprotease essencial no ciclo de replicação dos vírus da dengue, uma vez que a clivagem da proteína prM por essa endoprotease torna as partículas virais maduras e capazes de serem liberadas da célula. Alguns trabalhos mostram a relação da presença de mutações no gene da furina com a perda da sua atividade catalítica. A dengue é uma doença que exibe três tipos de manifestações clínicas: dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Assim sendo, o presente trabalho buscou, por meio de técnicas moleculares, a análise da presença de mutações no domínio homo B, relacionado com a atividade catalítica da furina, na tentativa de associar mutações no gene desta proteína às diferentes manifestações clínicas da dengue. Além disso, não há na literatura nenhum trabalho que relaciona a presença de mutações nessa região com a gravidade da dengue, existindo apenas estudos comprovando a perda da atividade catalítica na furina mutada e a formação de partículas virais imaturas nessas mesmas condições.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Verificar a presença de mutações no domínio homo B do gene codificante da endoprotease furina.

3.2. Objetivos específicos

1. Realizar HRM com todas as amostras de DNA e selecionar aquelas que apresentarem mutação na região de interesse;
2. Sequenciar as amostras selecionadas por HRM e fazer a análise das mutações encontradas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística

Foram obtidas 23 amostras de pacientes com dengue e 11 com dengue grave, sendo que algumas já estavam com o DNA extraído e armazenado no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), e outras tiveram o DNA extraído a partir do sangue total. Além disso, 211 amostras de DNA de pacientes controles foram obtidas na Unidade de Emergência (UE) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP), incluindo amostras encaminhadas diretamente ao Laboratório de Virologia Molecular do Centro de Pesquisa em Virologia.

Este projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética Médica do Hospital das Clínicas da FMRP e submetido à aprovação da Secretaria de Saúde de Ribeirão Preto. O termo de consentimento foi obtido para todos os indivíduos que participaram desta pesquisa.

4.2. Extração do DNA

A extração das amostras de DNA foi feita com o kit GenElute™ Blood GenomicDNA (*Sigma-Aldrich*) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.3. Desenho dos *primers*

Foram desenhados dois pares de *primers*, um cujo fragmento resultante da amplificação apresenta 150 pb (par de *primers* A) e outro 1250 pb (par de *primers* B), sendo que ambos incluíram os aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp) localizados no domínio homo B (tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos *primers* desenhados.

	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Par de primers A</i>	5'-GGCGAGCCCAACACATC-3'	5'-GTGCTTGCTCTGTCCCTGC-3'
<i>Par de primers B</i>	5'-ACCTCAATGCCAACGACTG-3'	5'-GCGGTGCCATAGAGTACGAG-3'

4.4. Amplificação do domínio homo B por PCR em Tempo Real

4.4.1. Padronização da reação por PCR convencional

Para padronizar a reação de PCR, a amplificação da região de interesse foi realizada inicialmente com o kit *TopTaq Master Mix* (QIAGEN, California, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando o DNA de uma das amostras (20 ng/μl) e o par de *primers* B. A concentração inicial dos *primers* estava à 10 μM e foram utilizadas três diferentes temperaturas de *annealing*: 55°C, 57°C e 60°C. O produto de PCR foi aplicado com *loading dye* e o intercalante de DNA *Gel Red* em um gel de agarose 2%, a 80 V, por 1 hora. Após estabelecer as concentrações e temperaturas ideais, foi feita a PCR convencional de todas as amostras.

4.4.2. Purificação do DNA a partir do gel de agarose

As bandas de DNA foram recortadas do gel de agarose e purificadas com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.3. Padronização da reação de PCR em Tempo Real

A reação de PCR em Tempo Real foi realizada com o kit *MeltDoctor™ HRM Master Mix*, utilizando o par de *primers* A e o DNA purificado (item 4.4.2.). O volume final da reação foi padronizado para 10 μl, a concentração inicial dos *primers* estava à 5 μM e o DNA à 20 ng/μl. As temperaturas utilizadas na corrida no termociclador *7500 FAST Real Time PCR System* (Applied Biosystems) seguiram as recomendações do fabricante. Após estabelecer as concentrações ideais, foi feita a PCR em Tempo Real de todas as amostras.

4.4.4. Análise por High Resolution Melting (HRM)

Ao final da reação de PCR em Tempo Real, todas as amostras foram analisadas com o *software* HRM (Life Technologies). Esse *software* gera todos os dados necessários para a análise da PCR em Tempo Real, como temperaturas de *melting*, genotipagem de todas as amostras, além de gerar os gráficos com as curvas das diferentes variantes.

4.5. Reação de sequenciamento do DNA

Para cada amostra a ser sequenciada em microplaca de 96 poços, foram utilizados aproximadamente 100 ng do DNA purificado (item 4.4.2.), 3,2 pmol de *primers* (*primers* B), 2 µl de “Big Dye” (deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos fluorescentes, enzima Taq DNA-Polimerase), 2 µl de tampão “Big Dye” (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM de Cloreto de Magnésio) e água milli-Q estéril, para completar o volume final de 10 µl. A termociclagem foi feita de acordo com as recomendações do fabricante. Após a amplificação, as amostras foram purificadas com o kit *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup* (Affymetrix), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.1. Precipitação das amostras

Em cada poço da placa de 96 poços, foi adicionado 1 µl de EDTA a 125 mM, 1 µl de NaOAc a 3 M (pH 4,8 a 5,2) e 40 µl de etanol 100% gelado. Após misturar bem com a pipeta, a placa foi incubada na geladeira por 30 minutos e centrifugada a 2250 g durante 40 minutos. Ao final dessa centrifugação, a placa foi invertida na pia para a remoção do etanol e centrifugada invertida em papel, por 1 minuto a 185 g. Em seguida, foram adicionados 100 µl de etanol 70%, preparado no momento do uso, e a placa foi novamente centrifugada a 2250 g por 20 minutos. Novamente, a placa foi invertida na pia para a remoção do etanol e centrifugada invertida em papel, por 1 minuto a 185 g. Em cada poço, foram adicionados 10 µl de formamida HiDye. Antes das amostras serem sequenciadas, elas foram desnaturadas em um termociclador por 5 minutos a 95°C e mantidas no mínimo por 3 minutos a 4°C.

4.6. Análise das sequências genômicas

As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas para a remoção das regiões intrônicas utilizando o programa *DNASStar Lasergene* e foram alinhadas com uma sequência de RNA mensageiro do gene da furina, disponível no *GenBank* (número de acesso: X17094.1), utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização da reação por PCR convencional

A reação de PCR convencional foi realizada inicialmente com uma amostra de DNA (figura 7. A.) utilizando o par de *primers B* e, após a padronização, a reação de PCR foi realizada com todas as amostras. A figura 7 mostra que todas as amostras testadas foram amplificadas na região de interesse, sem a formação de dímeros.

5.2. Purificação do DNA a partir do gel de agarose

Todas as bandas de 1250 pb foram purificadas do gel de agarose e o DNA purificado foi utilizado como molde para a reação de PCR em Tempo Real utilizando o par de *primers A*. Para confirmar a presença do fragmento de 150 pb, foi realizada a PCR convencional utilizando o DNA purificado de algumas amostras e o par de *primers A*. O resultado do gel de eletroforese é mostrado na figura 8.

Figura 8. Gel de eletroforese mostrando o fragmento de 150 pb obtido após a realização de uma segunda PCR convencional. Na ordem: marcador de 100 pb, controle negativo (neg) e amostras de DNA purificado de diferentes pacientes.

5.3. PCR em Tempo Real e análise por HRM

Após a realização da PCR em Tempo Real de todas as amostras foi feita a análise por HRM. A figura 9 mostra os gráficos obtidos por esse software para as amostras dos grupos “Dengue” e “Dengue grave”. A figura 9A mostra que todas as amostras desses dois grupos representam apenas uma variante, ou seja, não foi detectada nenhuma mutação. Já a figura 9B mostra a presença de apenas um pico bem definido da temperatura de *melting*, o que significa que todas as amostras representam a mesma variante

Figura 9. Amostras dos grupos “Dengue” e “Dengue grave” analisadas por HRM. A. Aligned melt curves. B. Derivative melt curves.

A figura 10 mostra os gráficos obtidos pelo HRM de algumas amostras do grupo “Controle”. Diferente dos outros grupos, das 211 amostras, 57 foram classificadas como sendo diferentes variantes, ou seja, que apresentam alguma mutação na região amplificada.

Comparando a figura 10A com a 9A é possível perceber que as curvas não se sobrepõem como as mostradas em azul, o que representa as diferenças nas temperaturas de *melting* das amostras do grupo “Controle”, classificadas como diferentes variantes. Apesar de ser nítida a sobreposição dos picos de temperatura na figura 9B, o que condiz com a classificação de todas as amostras como uma única variante, a figura 10B não evidencia as diferenças de temperatura, o que é mostrado apenas pela diferença de cor dos picos.

Figura 10. Amostras do grupo “Controle” analisadas por HRM. A. *Aligned melt curves*. B. *Derivative melt curves*.

5.4. Sequenciamento das amostras selecionadas por HRM

As 57 amostras classificadas como diferentes variantes pelo HRM foram submetidas ao sequenciamento, mas 27 não atingiram a qualidade necessária para essa análise e 30 foram sequenciadas corretamente. A figura 11 mostra o alinhamento da sequência de RNA mensageiro da furina (1ª sequência da figura) com as 30 sequências obtidas, com destaque para a região nucleotídica referente aos aminoácidos RGD. O alinhamento mostrou que na região do sítio catalítico da furina, apesar do HRM ter apontado a presença de mutações, não há nenhuma mutação na região de interesse, havendo o alinhamento completo da sequência nucleotídica das amostras com a sequência do RNA mensageiro original do gene da furina.

Figura 11. Alinhamento das amostras do grupo “Controle” com a sequência de RNA mensageiro da furina. Destaque da sequência de nucleotídeos referente aos aminoácidos “RGD”.

Apesar da região dos aminoácidos “RGD” não apresentar nenhuma mutação em nenhuma das amostras analisadas, a 3ª sequência da figura 11 apresentou 3 inserções: nucleotídeos G, A e C. Porém, a análise do cromatograma revelou que a qualidade do sequenciamento nessa região dessa determinada amostra não estava favorável, como pode ser visto na figura 12.

Figura 12. Cromatograma mostrando as inserções detectadas pelo sequenciamento. As setas indicam o pico referente à cada inserção. Azul: inserção do nucleotídeo G. Rosa: inserção do nucleotídeo A. Verde: inserção do nucleotídeo C.

5.4.1. Sequenciamento das amostras dos grupos “Dengue” e “Dengue grave”

Como as amostras do grupo “Controle” selecionadas pelo HRM não apresentaram nenhum tipo de mutação, por sequenciamento, na região de interesse, as amostras dos outros dois grupos, grupo “Dengue” e “Dengue grave”, também foram sequenciadas, apesar de não terem sido classificadas como diferentes variantes. Da mesma forma, nenhuma delas mostrou a presença de qualquer mutação na região correspondente à sequência dos aminoácidos RGD, como mostra a figura 13.

Figura 13. Alinhamento das amostras dos grupos “Dengue” e “Dengue grave” com a sequência de RNA mensageiro da furina. Destaque da sequência de nucleotídeos referente aos aminoácidos “RGD”.

5.4.2. Análise de outras mutações por sequenciamento

Apesar do fragmento analisado por HRM incluir, dentre as mutações descritas na literatura, apenas a região dos aminoácidos RGD, o sequenciamento incluiu uma região maior, abrangendo o aminoácido que é mutado (Trp para Arg) nas células *LoVo* (células de adenocarcinoma humano) na posição 547 da sequência de aminoácidos do domínio homo B. Essa análise foi importante para verificar se essa mutação seria, de alguma forma, responsável pelas diferentes manifestações da dengue, já que as células *LoVo* não produzem furina ativa, de tal forma que ela não é capaz de deixar o retículo endoplasmático das células (Takahashi *et al*, 1995). Da mesma maneira, nenhuma mutação foi detectada nessa sequência, como pode ser visto nas figuras 14A e 14B.

5.5. Análise da qualidade da genotipagem pelo valor do *Silhouette Score*

A análise da qualidade da genotipagem foi realizada por meio do valor obtido pelo *Silhouette Score*. Das 57 amostras classificadas como diferentes variantes pelo HRM, apenas 3 tiveram o valor do *Silhouette Score* abaixo de 0.8 (tabela 2), sendo o valor ideal maior ou igual a 0.8. Isso indica que, segundo esse valor, a classificação da grande maioria das amostras como mutantes foi correta, porém o sequenciamento mostrou que todas as amostras alinharam perfeitamente com a sequência do RNA mensageiro da furina, sem a presença de qualquer mutação.

Tabela 2. Valor do *Silhouette Score* das amostras classificadas como mutantes pelo HRM. Em vermelho estão as amostras que obtiveram valor menor que 0.8.

Amostra	<i>Silhouette Score</i>
1	0.913
2	0.750
3	0.947
4	0.818
5	0.905
6	0.801
7	0.981
8	0.852
9	0.849
10	0.987
11	0.919
12	0.904
13	0.836
14	0.869
15	0.951
16	0.978
17	0.950
18	0.916
19	0.809
20	0.813
21	0.968
22	0.946
23	0.865
24	0.957
25	0.980

26	0.959
27	0.629
28	0.790
29	0.900
30	0.867
31	0.884
32	0.894
33	0.847
34	0.934
35	0.895
36	0.922
37	0.942
38	0.953
39	0.947
40	0.889
41	0.941
42	0.944
43	0.907
44	0.950
45	0.912
46	0.952
47	0.922
48	0.932
49	0.871
50	0.899
51	0.942
52	0.820
53	0.952
54	0.960
55	0.958
56	0.948
57	0.841

6. DISCUSSÃO

A dengue é uma doença que acomete cada vez mais a população mundial, sendo a prevenção e o controle do vetor as únicas formas de diminuir os casos de infecção (Horstick *et al*, 2015). Existem alguns fatores que justificam o aumento anual do número de casos, como o crescimento populacional associado à urbanização mal planejada, principalmente nos países tropicais em desenvolvimento, habitações precárias e problemas nos sistemas de água e esgoto (Gubler, 1998). Como resultado, ocorrem cerca de 390 milhões de infecções pelos vírus dengue anualmente em todo o mundo (Bhatt *et al*, 2013). Por isso, é muito importante o entendimento dessa doença, bem como o estudo de fatores do hospedeiro, no caso o ser humano, que podem estar relacionados com a manifestação clínica da dengue.

Sabe-se que a endoprotease furina é extremamente importante no ciclo de replicação dos vírus dengue, uma vez que ela cliva a proteína viral prM em proteína M madura, sendo esse processo essencial para a maturação viral e liberação dos vírus infecciosos da célula (Pierson and Diamond, 2012; Halstead, 2003). Fatores genéticos estão relacionados diretamente com a atividade catalítica dessa endoprotease. Alguns estudos mostram que a presença de mutações em algumas regiões do gene da furina podem levar à modificação e até mesmo à perda de sua atividade catalítica. Nesse caso, a maturação das partículas virais pode ser prejudicada, já que a proteína prM não será clivada e, consequentemente, o vírus permanecerá imaturo (Lee *et al*, 2013).

Takahashi e colaboradores (1995) realizaram um estudo que indica a importância do domínio homo B, domínio do gene da furina relacionado com a sua atividade catalítica. Nesse trabalho, eles mostraram que células de adenocarcinoma humano (*LoVo cells*) apresentam uma mutação de apenas um aminoácido por outro, no caso o triptofano (Trp) pela arginina (Arg) na posição 547 da sequência de aminoácidos do domínio homo B, e essa alteração leva à perda completa da ativação autocatalítica da furina, de tal maneira que a forma mutante não é capaz de deixar o retículo endoplasmático.

Outro estudo de grande importância foi feito por Zybert e colaboradores (2008). Eles produziram partículas virais imaturas de DENV-2 em células *LoVo*, que não produzem a endoprotease furina, e compararam-na com a produção de partículas virais em células de mosquito (C6/36), as quais expressam a furina normalmente.

Como resultado, foi observado que o poder de infecção das partículas imaturas produzidas pela linhagem de células de adenocarcinoma humano era significativamente menor que o poder de infecção das partículas maduras produzidas pelas células de mosquito. Além disso, trataram *in vitro* as partículas virais imaturas com furina exógena para verificar se a infectividade dos vírus podia ser recuperada. O resultado desse trabalho mostrou que, após o tratamento com furina, a infectividade aumentou drasticamente, demonstrando que a perda do poder de infecção pelo vírus imaturo foi devido à ausência da clivagem da proteína prM em proteína M pela furina.

Já o trabalho desenvolvido por Hatsuzawa e colaboradores (Hatsuzawa *et al*, 1992) foi essencial para demonstrar a importância do domínio homo B para a furina. Nesse trabalho, eles inseriram *stop* códons em diversas regiões do gene da furina e cada forma mutante foi co-expressa com a pró-renina, um substrato que também é clivado pela endoprotease. O objetivo desse experimento foi mostrar se a perda de uma determinada região da furina inativa sua função, ou seja, se a pró-renina deixa de ser clivada.

Para isso, foi feita, inicialmente, uma mutação que levou à perda da região transmembrana da furina e como resultado eles viram que ela manteve a sua atividade, ou seja, a pró-renina foi clivada. Em seguida, foi feita uma outra mutação que levou à perda da região transmembrana e da região rica em cisteína. Da mesma forma, a furina manteve a sua atividade. Porém, quando a mutação foi inserida no interior do domínio homo B, a furina perdeu a sua atividade e a pró-renina deixou de ser clivada, o que comprova a importância desse domínio (Hatsuzawa *et al*, 1992).

A furina faz parte da família das pró-proteínas convertases, endoproteases responsáveis pela conversão de precursores de proteínas em suas formas biologicamente ativas, por meio da clivagem de um sítio marcado por uma determinada sequência de aminoácidos. Juntamente à ela, outras seis endoproteases constituem essa família, sendo elas PC1, PC2, PACE4, PC4, PC5 e PC7 (Nakayama, 1997). Os aminoácidos RGD são conservados em todas elas, com exceção de PC7 (Lusson *et al*, 1997), e por isso eles são alvos de estudo para o entendimento da função do domínio homo B.

Lusson e colaboradores (Lusson *et al*, 1997) demonstraram que o processamento dessas endoproteases no interior do retículo endoplasmático fica comprometido quando são feitas mutações nesses aminoácidos. Sabe-se que a

clivagem dos zimógenos, precursores enzimáticos inativos, é sensível a mutações ou deleções no domínio homo B (Zhong *et al*, 1996).

Assim sendo, o presente trabalho buscou analisar a presença de possíveis mutações nessa sequência conservada, utilizando a análise por *High Resolution Melting*. Essa técnica tem sido utilizada principalmente para estudos de doenças genéticas humanas (Taylor, 2009) e grande parte dos trabalhos comprova a alta sensibilidade do HRM na detecção de heterozigotos, sendo que substituições, inserções e deleções podem ser detectadas por esse método (Dobrowolski *et al*, 2005; Lonie *et al*, 2006; Nomoto *et al*, 2006).

Num trabalho comparativo realizado por Ihle e colaboradores (Ihle *et al*, 2014), tanto o HRM como o sequenciamento de Sanger foram capazes de detectar mutações raras no gene BRAF (proto-oncogene B-Raf) com 100% de especificidade. Porém, vale ressaltar que o HRM é apenas um método de *screening*, não sendo possível verificar o tipo de mutação detectada, sendo, para isso, inevitável a utilização do sequenciamento (Jancik *et al*, 2012).

No presente trabalho, *amplicons* de 150 pb foram analisados por HRM com a intenção de identificar a presença de mutações na região dos aminoácidos RGD do domínio homo B da endoprotease furina. Entretanto, apesar de muitas amostras terem sido classificadas pelo HRM como sendo diferentes variantes, ou seja, que apresentam mutação na região estudada, o sequenciamento mostrou que nenhuma delas apresentava qualquer tipo de mutação. Uma possível explicação para isso é a utilização de diferentes métodos para a extração do DNA das amostras. A maioria das amostras dos grupos “Dengue” e “Dengue grave” já estavam previamente extraídas e armazenadas, sendo apenas descongeladas para a sua utilização nesse trabalho.

Já as amostras do grupo “Controle” foram extraídas com o kit GenElute™ Blood GenomicDNA (Sigma-Aldrich), o qual pode apresentar diferença nas concentrações de sal dos *buffers* quando comparado àqueles do kit utilizado anteriormente para a extração das outras amostras. Isso foi visto em alguns trabalhos, nos quais amostras extraídas em diferentes laboratórios, utilizando diferentes *buffers*, produziram variações nas curvas de *melting* (Seipp *et al*, 2007; Leener *et al*, 2008). Além disso, a qualidade das amostras também pode variar. A maioria das amostras do grupo “Controle” foi obtida na Unidade de Emergência (UE) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) e, por isso, o seu armazenamento após a coleta não foi monitorado.

A soma de todos os resultados obtidos mostrou que a análise da região de estudo desse trabalho não é ideal quando feita por HRM e sim, por sequenciamento. Considerando apenas os resultados obtidos com esta técnica, é possível dizer que as manifestações mais graves da dengue não estão relacionadas com a presença de mutações no domínio homo B do gene da furina, região de extrema importância para a atividade catalítica dessa endoprotease. Entretanto, o número de amostras foi pequeno e é possível que com um número maior alguma evidência para o desenvolvimento de formas graves em infecções assintomáticas possa ser observada.

7. CONCLUSÃO

1. Nesse trabalho, o HRM não se mostrou adequado para a verificação de mutação no gene estudado;
2. O sequenciamento de Sanger, nesse caso, é melhor para a análise de mutação de um número pequeno de amostras;
3. Por sequenciamento, a gravidade da dengue não está relacionada com a presença de mutação na região dos aminoácidos “RGD” do domínio homo B da endoprotease furina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis. Applied Biosystems.

ANDERSON, E. D., MOLLOY, S. S., JEAN, F., FEI, H., SHIMAMURA, S., AND THOMAS, G. (2002). The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 277, 12879–12890.

BARROS, M. C. E. S. (2007). Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o sistema baculovírus de expressão. Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R. W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*.

Boletim epidemiológico, Guia de vigilância em saúde – Ministério da Saúde. (2016). Volume 47, número 20.

BRICKS, L. F. (2004). Vacinas para a dengue: perspectivas. Revisão e Ensaio. Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

CALVERT, A. E.; HUANG, C. Y. H., KINNEY, R. M.; ROEHRING, J. T. (2005). Non-structural proteins of dengue 2 virus offer limited protection to interferon-deficient mice after dengue 2 virus challenge. *Journal of General Virology*.

CANSANÇÃO, I. F.; CARMO, A. P.; LEITE, R. D.; RABENHORST, S. H. (2016). Association of Polymorphisms in IL1 β -511C>T, IL1RN 86 bp VNTR, and IL6 -174G>C Genes with Clinical Dengue Signs and Symptoms in Brazilian Dengue Patients. *Viral Immunol.*

CAPEDING, M. R.; TRAN, N. H.; HADINEGORO, S. R. *et.al.* (2014). Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. Volume 384, Issue 9951, 11–17, Pages 1358–1365.

CARDOSA, M. J.; HOOI, T. P.; SHAARI, N. S. (1988). Development of a dot enzyme immunoassay for dengue 3: A sensitive method for the detection of antidengue antibodies. *J Virol Methods*; 22: 81 – 88.

CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; HILEMAN, R. E.; FROMM, J. R.; ESKO, J.; LINHARDT, R. J.; MARKS, R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*. 3(8):866-71.

DOBROWOLSKI, S.; MCKINNEY, J.; AMAT DI SAN FILIPPO, C.; GIAK SIM, K.; WILCKEN, B.; LONGO, N. (2005) Validation of dye-binding/highresolution thermal denaturation for the identification of mutations in the SLC22A5 gene. *Hum. Mutat*. 25, 306–313

ERALI, M.; VOELKERDING, K. V.; WITTEWER, C. T. (2008). High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine. *Exp Mol Pathol*. 85(1): 50–58. doi:10.1016/j.yexmp.2008.03.012.

GUBLER, D.K.G.; MARKOFF, L. (2007). Flaviviridae: The viruses and their replication. In Knipe DMH, Peter M. (ed.), *Fields Virology*, 5th Edition ed, vol. I. Lippincott Williams & Wilkins.

GUBLER, D. J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical microbiology reviews*. p. 480–496, volume 11 número 3.

Guia de Vigilância Epidemiológica - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. (2005) Brasília – DF. 6ª edição. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

GUNDRY, C., VANDERSTEEN, J., REED, G., PRYOR, R., CHEN, J., WITTEWER, C. (2003) Amplicon melting analysis with labelled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin. Chem*. 49, 396–406

GUZMAN, M. G., AND G. KOURI. (1996). Advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 3:621–627.

HALSTEAD, S. B. (1997). Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Gubler DJ, Kuno G, Editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International; p.23-44.

HALSTEAD, S. B. (2008). *Dengue (Tropical Medicine/ Science and Practice – Vol. 5)*. Imperial College Press.

HALSTEAD, S.B. (2003). Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in virus research* 60:421-467.

HALSTEAD, S.B., DEEN J. (2002). The future of dengue vaccines. *Lancet* 360:1243-1245.

HATSUZAWA, K.; MURAKAMI, K.; NAKAYAMA, K. (1992). Molecular and Enzymatic Properties of Furin, a Kex2-Like Endoprotease Involved in Precursor Cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg Sites. *J. Biochem.* 111, 296-301.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. Volume 3(4), p. 376-396.

HEINZ, F.X., STIASNY, K. (2012). Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 30:4301-4306.

HORSTICK, O.; TOZAN, Y.; WILDER-SMITH, A. (2015). Reviewing Dengue: Still a Neglected Tropical Disease? *PLoS Negl Trop Dis* 9(4): e0003632. doi:10.1371/journal.pntd.0003632

HRM Experiments – User guide, Applied Biosystems.

IHLE, M. A.; FASSUNKE, J.; KÖNIG, K.; GRÜNEWALD, I.; SCHLAAK, M.; KREUZBERG, N.; TIETZE, L.; SCHILDHAUS, H. U.; BÜTTNER, R.; MERKELBACH-BRUSE, S. (2014). Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer*, 14:13.

Informe Semanal Dengue - Governo do Estado do Ceará, Secretaria da Saúde. (2013).

JANCIK, S.; DRABEK, J.; BERKOVCOVA, J.; XU, Y. Z.; STANKOVA, M.; KLEIN, J.; KOLEK, V.; SKARDA, J.; TICHY, T.; GRYGARKOVA, I.; RADZIOCH, D.; HAJDUCH, M. (2012). A comparison of direct sequencing, pyrosequencing, high resolution melting analysis, TheraScreen DxS, and the K-ras StripAssay for detecting KRAS mutations in non small cell lung carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res*, 31:79.

KELLY, E. P.; GREENE, J. J.; KING, A. D.; INNIS, B. L. (2000). Purified dengue 2 virus envelope glycoprotein aggregates produced by baculovirus are immunogenic in mice. *Vaccine*, Volume 18, Issue 23, 22 May 2000, p.2549–2559.

LEE, P.D., MUKHERJEE, S., EDELING, M.A., DOWD, K.A., AUSTIN, S.K., MANHART, C.J., DIAMOND, M.S., FREMONT, D.H., PIERSON, T.C. (2013). The Fc Region of an Antibody Impacts the Neutralization of West Nile Viruses in Different Maturation States. *J. Virol.* 87(24):13729. DOI: 10.1128/JVI.02340-13.

LEENEER, K.; COENE, I.; POPPE, B.; PAEPE, A.; CLAES, K. (2008). Rapid and Sensitive Detection of BRCA1/2 Mutations in a Diagnostic Setting: Comparison of Two High-Resolution Melting Platforms. *Clinical Chemistry* 54:6 982–989.

LEI, R.X., SHI, H., PENG, X.M., ZHU, Y.H., CHENG, J., CHEN, G.H. (2009). Influence of a Single Nucleotide Polymorphism in the P1 Promoter of the Furin Gene on Transcription Activity and Hepatitis B Virus Infection. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/hep.23062.

LI, L., LOK, S. M., YU, I. M., ZHANG, Y., KUHN, R. J., CHEN, J., ROSSMANN, M. G. (2008). The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science* 319, 1830.

LILJEQVIST, S.; STAHL, S. (1999). Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. Review article. *Journal of Biotechnology* 73; 1–33.

LONIE, L., PORTER, D., FRASER, M., COLE, T., WISE, C., YATES, L., WAKELING, E., BLAIR, E., MORAVA, E., MONACO, A. and RAGOISSIS, J. (2006) Determination of the mutation spectrum of the EXT1/EXT2 genes in British Caucasian patients with multiple osteochondromas, and exclusion of six candidate genes in EXT negative cases. *Hum. Mutat.* 27, 1160

LUSSON, J., BENJANNET, S., SAVARIA, M., CHRETIEN, M. AND SEIDAH, N. G. (1997). The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem. J.* 326, 737-744.

MACKENZIE, J.S., GUBLER, D.J., PETERSEN, L.R. (2004). Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature medicine* 10:S98-109.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D. HARRISON, S. C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* v. 100 (12), p. 6986-6991, 2003.

NAKAYAMA, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins, *Biochem. J.* 327, 625±635.

NOMOTO, K., TSUTA, K., TAKANO, T., FUKUI, T., YOKOZAWA, K., SAKAMOTO, H., YOSHIDA, T., MAESHIMA, A., SHIBATA, T., FURUTA, K. *et al.* (2006) Detection of EGFR mutations in archived cytologic specimens of non-small cell lung cancer using high-resolution melting analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* 126, 608–615

Public Immunization Starts. Disponível em: <http://www.dengue.info/#overlay=content/public-immunization-starts> Acessado em 17/05/2016.

REED, G. H. AND WITTEWER, C. T. (2004). Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. *Clinical Chemistry*, 50:10, 1748–1754.

REY, F. A. (2003). Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. *Virologie Moléculaire et Structurale*, Unité Mixte de Recherche 24721157, Centre National de la Recherche Scientifique et Institut National de la Recherche Agronomique, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

RODENHUIS-ZYBERT, I.A.; VAN DER SCHAAR, H.M.; DA SILVA VOORHAM, J.M.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H., LEI, H-Y, *et al.* (2010). Immature Dengue Virus: A Veiled Pathogen? *PLoS Pathog* 6(1): e1000718.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. (2011). Partial maturation: an immune-evasion strategy of dengue virus? *Review, Cell Press.*, Vol. 19, No. 5.

SEIPP, M. T.; DURTSCHI, J. D.; LIEW, M. A.; WILLIAMS, J.; DAMJANOVICH, K.; PONT-KINGDON, G., *et al.* (2007). Unlabeled oligonucleotides as internal temperature controls for genotyping by amplicon melting. *J Mol Diagn*;9:284 –9.

STEPHENSON, J. R. (2005). Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Public Health Reviews*.

TASSANEETRITHEP, B., BURGESS, T. H., GRANELLI-PIPERNO, A., TRUMPFHELLER, C., FINKE, J., SUN, W., ... MAROVICH, M. A. (2003). DC-SIGN

(CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(7), 823–829. <http://doi.org/10.1084/jem.20021840>

TAKAHASHI, S., NAKAGAWA, T., KASAI, K., BANNO, T., DUGUAY, S.J., VAN DE VEN, W.J.M., MURAKAMI, K., NAKAYAMA, K. (1995). A Second Mutant Allele of Furin in the Processing-incompetent Cell Line, LoVo: Evidence for involvement of the homo B domain in autocatalytic activation. *J. Biol. Chem.* 1995, 270:26565-26569. doi: 10.1074/jbc.270.44.26565.

TAUIL, P. L. (2001). Urbanização e ecologia do dengue. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro.

TIMERMAN, A.; NUNES, E.; LUZ, K. (2012). *Dengue no Brasil – Doença urbana*. 1ª edição. Limay Editora. São Paulo – SP.

TIRADO, C.; YOON, K. J. (2003). Antibody-Dependent Enhancement of Virus Infection and Disease. *Viral immunology*. Volume 16, Number 1. Pp. 69–86.

WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. TDR/World Health Organization. (2009).

WHO. Dengue, dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome in the context of the integrated management of childhood illness (Geneva, World Health Organization). (2005).

ZHONG, M.; BENJANNET, S.; LAZURE, C.; MUNZER, S.; SEIDAH, N. G. (1996). Functional analysis of human PACE4-A and PACE4-C isoforms: identification of a new PACE4-CS isoform. *FEBS Letters* 396, 31-36.

ZYBERT, I.A., ENDE-METSELAAR, H.V.D., WILSCHUT, J., SMIT, J.M. (2008). Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *Journal of General Virology*. 89, 3047–3051.