



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

MILENE ROCHA RIBEIRO

**Efeito da infecção pelo vírus da Febre Amarela no mecanismo
de splicing celular**

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

São José do Rio Preto-SP

2014

Milene Rocha Ribeiro

Efeito da infecção pelo vírus da Febre Amarela no mecanismo de splicing celular

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

São José do Rio Preto-SP

2014

Milene Rocha Ribeiro

Efeito da infecção pelo vírus da Febre Amarela no mecanismo de splicing celular

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Banca examinadora

Prof.Dr. Maurício Lacerda Nogueira
Professor Livre Docente
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

1ºExaminador: Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG.

2ºExaminador: Profª. Drª. Fátima Pereira de Souza
UNESP – São José do Rio Preto, SP.

São José do Rio Preto, 23 de maio de 2014.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>FLAVIVIRUS</i>	1
1.2 FEBRE AMARELA	2
1.3 REPLICAÇÃO DE FEBRE AMARELA	3
1.4 PROCESSAMENTO DE RNA	7
1.5 MECANISMO DE SPLICING	8
1.6 SPLICEOSSOMO	9
1.7 SPLICING X VÍRUS	12
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVO.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Células e vírus.....	17
4.2 Co-imunoprecipitação.....	17
4.3 Ensaio de splicing alternativo do replicon pEGFP-C3-ADAR2.....	18
4.4 Avaliação do efeito da superexpressão transiente de hSlu7 na replicação do vírus da Febre Amarela em cultura celular.....	19
4.4.1 Superexpressão de hSlu7.....	19
4.4.2 qRT-PCR para avaliação da replicação de YFV	20
4.5 Ensaio de splicing alternativo de XBP-1.....	21
4.6 Ensaio de alteração splicing alternativo de ILR7.....	21
4.7 Ensaio de splicing alternativo de FGFR2.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSAO ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	23
5.1 Co-imunoprecipitação.....	23
5.2 Avaliação de splicing alternativo do replicon pEGFP-C3-ADAR2.....	24
5.3 Avaliação do efeito da superexpressão transiente de hSlu7 na replicação do vírus da Febre Amarela em cultura celular.....	27
5.4 Avaliação de splicing alternativo de XBP-1/ IRE1- α	28

5.5 Avaliação de alterações das isoformas do replicon de pI12-ILR7.....	31
5.6 Avaliação de splicing alternativo de FGFR2.....	34
6. CONCLUSÃO.....	40

Dedico aos meus pais, Clóvis e Marlene e minhas irmãs, Marcelle e Melissa.

Pelo apoio, perseverança e paciência essenciais para a realização desse trabalho.

Agradecimentos

- ✓ A Deus, que ilumina meu caminho.

- ✓ Ao meu orientador, Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, pela a oportunidade de trabalhar neste projeto e imenso aprendizado adquirido nesses dois anos.

- ✓ Ao Dr. Mariano Garcia-Blanco e Dr. Gaddiel Galarza Munoz, Duke University e Dr. Gil Ast, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Israel.

- ✓ Aos meus pais, Clóvis e Marlene, e irmãs, Melissa e Marcelle, meu profundo respeito e admiração. É uma honra e privilégio compartilhar minha caminhada com vocês.

- ✓ À UNESP-IBILCE, todos os professores e funcionários.

- ✓ À FAMERP: toda a equipe do Laboratório de Pesquisa em Virologia, em especial, Dra. Ana Carolina Bernardes Terzian e Dra. Alessandra Vidotto pelo apoio científico, a todos do Laboratório de Microbiologia, UPGEM, LIM e ao Laboratório de Bioinformática.

- ✓ Aos colegas de trabalho: Carlos Araki, Danila Vedovello, Leônidas Pires, Eliane, Juliana Tiemi, Tauyne, Kátia Ozanic, Ceyla, Maisa Parra, Mayra Mataruco, Simone Quintão, Carol Pacca, Luana Faria, Ana Teresa, Paulo Peitl, Valéria Chamas e Tatiane Colombo.

- ✓ A profa. Dra. Orfa Yineth e Marlon Mattos do Laboratório de Fisiologia Experimental –Famerp, pela colaboração e gentileza.

- ✓ A Dra. Marisa A. Hong e Dra. Raquel Fazioli do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

- ✓ À equipe do suporte científico da BD Biociences, Reginaldo Sene, Maíra Santanna.

- ✓ À Dra. Jaqueline Germano de Oliveira do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisa René Rachou, Fiocuz-MG, minha profunda gratidão.

- ✓ À Msc. Alan e Dr. Rafael Pimenta do Laboratório de Microscopia, Centro de Pesquisa René Rachou, FioCruz-MG.

- ✓ A Embrapa CENARGEN e Embrapa Cerrado, especialmente meus orientadores, Dra. Andrea Del Pilar de Souza Peñalosa, Dra. Marisa Toniollo do Laboratório de Citogenética, Dr. Fábio Barreto e Dra. Ieda Carvalho do Laboratório de Microbiologia de solos, Dra. Elita Batista do Laboratório de Virologia e Controle Biológico e Dra. Sônia Bao da Universidade de Brasília pelas oportunidades, carinho e respeito. Minha admiração por vocês é imensa.

- ✓ Aos amigos: Fernando Bakker, Guilherme Senna Lima, Francielle Sclermer, Leandro Moraes, Jorge, Lívia Freitas e Marina Tagliari; Thayse Simonetti, Ingrid, Fernando Machado e Luciana Assunção.

Lista de Figuras

Figura 1.	Representação de poliproteína de YFV.....	4
Figura 2	Ciclo replicativo dos Flavivirus.....	6
Figura 3.	Comparação das estruturas secundárias de auto-splicing do grupo II.....	8
Figura 4.	O ciclo de spliceossomo.....	11

Figura 5.	Co-imunoprecipitação utilizando anti-GFP entre proteína hSlu7-GFP	20
Figura 6.	Representação esquemática do mini-gene ADAR2 e o possível splicing alternativo gerado pela regulação da proteína hSlu7.....	23
Figura 7.	Eletroforese em gel de agarose de 2% representando transcritos do mine.....	25
Figura 8.	Análise da porcentagem da média em triplicata da exclusão exon 8 na transcrição do mini-gene ADAR 2.....	24
Figura 9.	Análise da porcentagem da média em triplicata da exclusão exon 8 na transcrição do mini-gene ADAR 2.	25
Figura 10.	qRT-PCR para avaliação da superexpressão de hSlu7 na replicação viral.....	27
Figura 11.	Eletroforese em gel de agarose 3,5 % com isoformas de mRNAs de XBP-1 endógeno.....	28
Figura 12.	Porcentagem de isoformas de XBP-1. RNA total foi extraído de mRNAs de XBP-1.....	28
Figura 13.	Análise de ensaio em triplicada de porcentagem de inclusão de XBPs-1.....	29
Figura 14.	Representação esquemática da construção do mini-gene de IL7R.....	31
Figura 15.	Ensaio Receptor Interleucina-7. Células transfectadas com plasmídeo pI12	32
Figura 16.	Representação esquemática das construções repórteres de splicing alternativo. Plasmídeo pGIIIc ²	35
Figura 17.	Média de fluorescência estimada por citometria de fluxo. Células HepG2 e	

LLMCK2 estáveis, na presença e ausência de infecção por YFV.....	36
Figura 18. Sobreposição de Histograma.....	36
Figura 19. Dot plot de 50.000 eventos células estáveis LLMCK2. (A), controle	37

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ADAR2	Adenosine Deaminases acting on RNA
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
Brr2	RNA-dependent ATPase RNA helicase (DEIH box)
Bcl-2	Célula-B de linfoma 2

Co-IP	Coimunoprecipitação
CSFV	Classical Swine Fever Virus
CPSF1	Cleavage and Polyadenylation Specific factor 1
CRM1	Chromosome region maintenance 1
DENV	Vírus do dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEN	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
E	Envelope
EDTA	<i>Ethylene diamine tetracetic acid</i>
eIF3L	<i>Eukaryotic translation factor 3, subunit L</i>
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
Erk3	<i>Extracellular signal-regulated kinase 3</i>
EBV	<i>Epstein–Barr virus</i>
eIF3L	<i>Eukaryotic translation factor 3, subunit L</i>
ERdj4	Endoplasmic reticulum–localized DnaJ 4
EDEM	ER carbohydrate-binding protein
FGFR2	Receptor de Fator de crescimento de fibroblasto 2
FSB	Soro Fetal Bovino
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GBV-C	GB virus C
GRP78	Glucose-regulated protein 78
hSlu7	Pre-mRNA-splicing factor SLU7

HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSP70	70 kilodalton heat shock proteins
ISAR	Região de Silenciamento e Ativação Intrônica
IAS2	Sequência de Ativação de Intron 2
IL-8	Interleucina-8
IFN	Interferon
IPA	Poliadenilação Intrônica
ICP27	Infected cell protein 27
ISG	Gene Incentivador de Interferon
JEV	Vírus da encefalite Japonesa
JAK	Jun N-terminal kinase
MIF	Macrophage migration inhibitory
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
NPC	Complexo núcleo poro
Nup62	Nucleoporin 62kDa
NP-40	<i>nonyl phenoxy polyethoxy ethanol type 40</i>
NLS	Sinal de Localização Nuclear
NS	Proteína não-estrutural
ORF	<i>Open reading frame</i>

prM	Proteína precursora da proteína M
pb	Par de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
XRN1	Exoribonuclease 1
WNV	Vírus West Nile
WB	<i>Western blotting</i>
YFV	Vírus da febre amarela
C	Proteína do capsídeo viral
°C	Grau Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
E	Proteína do envelope viral
h	Hora
M	Molar
mA	Miliampere
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μL	Microlitro
μg	Micrograma

pmol	Picomol
%	Porcentagem
Δ	Deleção

RESUMO

O Vírus da Febre amarela (YFV) causa doença com considerável morbidade e mortalidade nas regiões tropicais. Diversos vírus possuem estratégias para a alteração dos processos celulares. Mecanismos de splicing celulares são essenciais para diversificar a expressão dos genes e podem aumentar seu potencial de gerar proteínas. A replicação de YFV e as interações entre proteínas virais e celulares não são totalmente conhecidas. A proteína celular hSlu7 possui sinal de localização nuclear e

tem um papel importante nas reações catalíticas do segundo passo do splicing. Estudos demonstram que sob infecção de YFV hSlu7 transloca para o citoplasma. A translocação de proteínas entre o citoplasma e o núcleo pode representar um mecanismo viral da regulação da expressão gênica. Este estudo teve como objetivo a caracterização da interação entre a proteína hSlu7 e NS5 viral, bem como estudar os efeitos de interações sobre os mecanismos de splicing alternativo após a infecção de YFV.

Para identificar interação de NS5 de YFV com hSlu7 foi realizado ensaio de co-immunoprecipitação. Para verificar alteração de splicing celular foram utilizados replicons pEGFP-ADAR, pI12-IL7R, pEGFP-FGFR2, bem como a alteração de isoformas de XBP-1 endógenos. Os resultados indicam que NS5 de YFV interage com proteína hSlu7 e que sua interação pode influenciar no metabolismo RNA celular. YFV demonstrou exercer modulação no splicing celular, a avaliação de replicons sugerem que em splicing dependente de hSlu7, bem como a independente ocorre uma regulação viral atuando sobre sítios de splicing fraco e que a interação hSlu7-NS5 pode alterar direta e indiretamente a regulação trans-acting.

Palavras-Chave: *Flavivirus*, splicing alternativo, interação proteína, proteína não estrutural NS5.

ABSTRACT

Yellow fever virus (YFV) causes disease with significant morbidity and mortality in tropical regions. Several viral strategies are avail for recruitment and alteration of the biochemical cellular processes. Cellular splicing mechanisms are essential to diversify the gene expression and increase it's proteomic potential. Replication of YFV and the interactions between viral and cellular proteins are unknown. The cellular protein hSlu7 has an nuclear localization and an important role in the second catalytic reaction

step of the alternative splicing. In our study group demonstrated that under YFV infection hSlu7 translocates to the cytoplasm. The translocation of proteins between nucleus and cytoplasm may represent a viral mechanism of cellular gene expression regulation, interference in the protein availability of the alternative splicing and viral replication control. This study aimed to characterize the interaction between the viral protein hSlu7 and NS5, as well as studying the effects of interactions on the mechanisms of alternative splicing after YFV infection. To identify interaction with YFV NS5 hSlu7 was conducted co-immunoprecipitation assay. To verify changes in cellular splicing replicons were used pEGFP-ADAR, PI12-IL7R, pEFGP-FGFR2 as well as the change of isoforms of XBP-1 endogenous. The results indicated that YFV NS5 protein interacts with hSlu7 and that their interaction may influence cellular metabolism RNA. YFV perform modulation on cellular splicing, the evaluation of replicons suggest that in hSlu7 splicing dependent and independent regulation occurs viral acting on weak splice sites and that the interaction hSlu7-NS5 can change directly or indirectly to regulate trans- acting.

Keywords: *Flavivirus*, alternative splicing, protein-protein interaction, protein nonstructural NS5

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Flavivirus*

Os *Flavivirus* são vírus que pertencem a um gênero da família *Flaviviridae*, que englobam outros gêneros o *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus* (ICTV, 2014). Apesar de suas particularidades, estes gêneros compartilham não apenas similaridades morfológicas, mas, também, estratégias de replicação e organização do genoma (LINDENBACH, et al. 2007).

Os gêneros *Hepacivirus* e *Pegivirus* possuem distribuição global e estima-se que infecções por HCV e GBV-C contaminem de 2 a 5% da população mundial (STAPLETON et al. 2011, KOOPOR et al. 2013). Já os *Pestivirus* são causadores de diversas doenças em animais, entre eles, os vírus de Diarréia Bovina Viral (BVDV-1 e 2), Peste Suína Clássica (CSFV) e HoBi-like ou BVDV-3 considerado vírus emergente deste grupo (THIEL et al. 2005; BAUERMANN et al. 2013).

O gênero *Flavivirus* compreende mais de 60 vírus distribuídos mundialmente, dos quais, 43 são importantes agentes patogênicos humanos, gerando grandes impactos econômicos, sociais e de saúde pública (MURPHY et al. 1995, FERNANDEZ-GARCIA et al. 2009).

Além disso, permanecem como uma constante e crescente preocupação em relação a reemergências virais e surgimento de novos vírus. Neste contexto, destacam-se o vírus Zika considerado emergente na África e o vírus West Nile (WNV) nas Américas (TAPPE et al. 2014, HADLER et al. 2014).

Com base na epidemiologia, antigênica e critérios filogenéticos, os *Flavivirus* podem ser divididos em quatro grupos, um possuem transmissão por vetores artrópode-mosquitos, um grupo por artrópode-carrapatos e o último por vetores não conhecidos, além dos flavivírus exclusivos de insetos (GOULD e GRITSUN, 2008).

O grupo de vírus transmitidos por artropodes é o maior e mais representativo causador de doença em humanos, também conhecida, como arboviroses. Os arbovírus são vírus transmitidos a hospedeiros vertebrados suscetíveis a artrópodes hematófagos infectados, podendo causar febres hemorrágicas, doença encefálica grave e doença febril, com considerável morbidade e mortalidade (SCARAMAZZINO et al. 2001; FIGUEIREDO, 2008).

No Brasil foram isolados onze flavivírus, entre eles os quatro sorotípos de Dengue, Bussuquara, Cacipacoré, Iguape, Ilhéus, Rocio, encefalite de Saint Louis (SLE) e Febre Amarela. Além destes, há evidências da circulação do WNV no país.

Pauvolid-Correa, et al (2011) relataram a detecção de anticorpos neutralizantes obtidos de equinos amostrados na região do Pantanal do Mato-Grosso do Sul. Recentemente, a evidência sorológica da atividade WNV em equinos e galinhas foi relatada no Pantanal brasileiro e somente em equinos na Paraíba, região nordeste do país (MELANDRI et al. 2012; SILVA, et al. 2013). No entanto, é necessário isolar o vírus em animais, vetores ou humanos para confirmar sua presença no país (ARAÚJO, 2011).

1.2 Febre Amarela

A Febre Amarela é uma doença infecciosa aguda, não contagiosa, cujo agente etiológico é um vírus envelopado chamado *Yellow Fever Virus* (YFV) (LINDENBACH e RICE, 2001).

Existem sete genótipos do YFV circulando no mundo: cinco genótipos em diferentes regiões da África (genótipo Africano Ocidental, Central, Africano Oeste, genótipo do Leste, genótipo Angola) e dois na América do Sul (genótipo I e II da América do Sul) (BARRET, 2010,).

O vírus é endêmico em regiões tropicais da África e da América Latina, com uma população total de mais de 900 milhões de pessoas. Na América Tropical, além do Brasil, são relatados casos em oito países: na Colômbia, Peru, Bolívia, Venezuela, Equador, Paraguai, Argentina e ocasionalmente, na Guiana Francesa (WHO, 2013).

Na África, onde ocorre maior disseminação, a Febre Amarela permanece endêmica em 34 países e é responsável por cerca de 90% de todos os casos notificados a *Organização Mundial da Saúde* (VASCONCELOS, 2002).

Há uma estimativa de 200.000 casos de Febre Amarela por ano, causando 30.000 mortes, em todo o mundo. O número de casos da doença tem aumentado ao longo das últimas duas décadas, devido ao declínio da população imunizada, o desmatamento, a urbanização, a circulação da população e alterações climáticas (WHO, 2013).

O reservatório natural deste vírus são primatas não-humanos que habitam florestas tropicais, apresentando como vetor principal mosquitos da família *Culicidae*, (DÉGALLIER, et al. 1992). Existem três tipos de ciclo de transmissão: silvestre,

intermediário e urbano. Todos os três ciclos existentes na África. Já na América do Sul, apenas ocorrem o ciclo silvestre e urbano (HANLEY, et al. 2013).

No ciclo silvestre, várias espécies de mosquitos são responsáveis pela transmissão, sendo que no Brasil os gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* são os principais vetores. O ciclo é mantido por primatas do gênero: *Alouatta*, *Callithrix*, *Rhesus*, *Cebus*, entre outros. O homem é infectado quando entra em contato com vetor de transmissão em áreas florestais ou periflorestais. No ciclo urbano, o homem é o hospedeiro amplificador e a transmissão ocorre diretamente ao homem pela picada do mosquito *Aedes aegypti* (ARAÚJO, et al. 2010).

No Brasil, a Febre Amarela urbana permanece erradicada desde 1942, quando foi registrada pela última vez, em Sena Madureira, no estado do Acre. No entanto, a febre amarela silvestre existe de forma endêmica e epidêmica e, em vários casos, muito deles fatais, são notificados anualmente (BATISTA et al. 2001).

De 2000 a 2010 foram registrados 324 casos de Febre Amarela silvestre, totalizando uma letalidade de 47,8%, com picos de incidência nos anos 2003, 59 casos, e 2008 com dois surtos em populações não vacinadas, resultando em 21 casos confirmados, com nove mortes (letalidade, 43%) na região sul do estado do Rio Grande do Sul e 28 casos com 11 óbitos (39%) no estado de São Paulo (ROMANO, et al 2014).

O Ministério da Saúde continua recomendar a vacinação contra a febre amarela a cada 10 anos, em áreas consideradas de risco, embora seja dada prioridade à vacinação primária de pessoas não vacinadas anteriormente nestas áreas. Devido às notificações de epizootias, população não vacinada em áreas consideradas sem risco, casos de febre amarela silvestre, entre outros fatores, permanece o risco de reintrodução da doença no ciclo urbano (ROMANO, et al. 2014).

1.3 Replicação do vírus da Febre Amarela

O vírus da Febre Amarela possui o genoma constituído de RNA de fita simples, polaridade positiva, com aproximadamente 11 kilobases de comprimento e apresenta um cap na posição 5' e ausência de poli-A na posição 3' (**Figura 1**). O vírion mede 25-40nm de diâmetro e é circundado por envoltório de natureza lipoproteica. A partícula íntegra (vírion mais envelope) mede entre 40-50nm (MONATH, 2001).

O genoma possui uma única fase aberta de leitura (ORF), flanqueadas por duas regiões não traduzidas (UTR) nas extremidades 5' e 3', contendo aproximadamente 100

e 500 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem estruturas secundárias conservadas que dão origem a estruturas de *stem-loop* (SL), que conferem estabilidade ao genoma e promove a circularização dos terminais 5' e 3', fornecendo sinais importantes para a regulação e expressão das proteínas virais (MARKOFF, 2003; BOLLATI, et al. 2010).

A região ORF do RNA viral expressa uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares, em três proteínas estruturais (prM, E e C) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Rice et al., 1985).

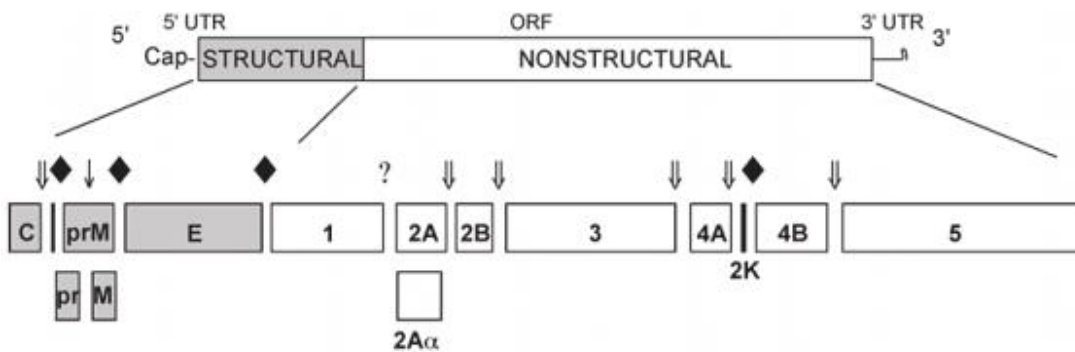


Figura 1: Representação de poliproteína de YFV. Três proteínas virais estruturais, C, capsídeo; prM, precursor da proteína de membrana M; E, envelope; e as sete proteínas não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Fonte KUMMER, 2006.

As proteínas estruturais codificam a formação de estrutura básica da partícula viral; a proteína prM codifica o precursor da proteína da membrana M, a proteína E dá origem ao envelope, enquanto a proteína C codifica a formação do capsídeo viral. A proteína E é responsável pela ligação do vírus na célula mediada por receptor, bem como pela fusão com a membrana endossomal, sendo o maior determinante antigênico viral (LINDENBACH, et al. 2007).

A proteína C forma o nucleocapsídeo viral e em sua região C-terminal apresenta um domínio hidrofóbico importante para a translocação ao retículo endoplasmático (RE), atuando como sequência sinal para o deslocamento da proteína prM (precursora da proteína M), (CHAMBERS et al. 1990, MONATH, 2001.)

A proteína M é formada a partir do processamento de sua precursora prM, clivada no Complexo de Golgi, sendo uma proteína de membrana de partículas virais maduras.

Já as proteínas não-estruturais são responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus incluindo replicação, virulência e patogenicidade. A proteína NS1 participa da replicação do RNA viral e pode ser encontrada associada à superfície celular e no meio extracelular de células infectadas de mamíferos. No meio extracelular está fortemente associada com a indução de resposta imune humoral. Esta proteína tanto forma um complexo com vias de complementos (C1s e C4), quanto promove a clivagem de C4 e C4b (FLAMAND et al. 1999; AVIRUTNAN et al. 2010).

A NS2A participa na replicação viral e pode estar associada à inibição de interferon. NS2B forma um complexo estável com a proteína NS3, agindo como um co-fator para a atividade serino-protease (KNIPE, 2007).

A proteína NS3 é uma proteína multifuncional, pois tem atividade de serino-protease na sua porção N-terminal, RNA-helicase na região C-terminal e, atividade de trifosfatase. As proteínas NS4A e B são hidrofóbicas, associadas à membrana. Estudos indicam interação NS4A com NS1 e formação de complexos com NS2B e NS3, com funções importantes na replicação do RNA (LINDENBACH, et al. 2007).

A proteína NS5 é a maior das proteínas virais, apresentando peso molecular de 100 KDa e é altamente conservada entre os *Flavivirus*. Apresenta atividade de RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* – RdRP) na região C-terminal e atividade de metiltransferase na porção N-terminal que está envolvida na metilação da estrutura *cap* 5' do RNA (REED et al., 1998; KNIPE, 2007).

A replicação viral inicia-se com a entrada da partícula viral mediada por receptor e adsorção subsequente na célula hospedeira por endocitose (**Figura 2**). Após a fusão do vírion à membrana da célula hospedeira, o RNA é liberado no citoplasma e traduzido em uma poliproteína (VAN DER SCHAAR et al., 2008).

Diversos receptores vêm sendo identificados para *Flavivirus* como GRP78, HSP70, Heparan-Sulfato (CHEN et al. 1999, REYES-DEL VALLE et al. 2005). Sommer, (2012) descreveu a participação de família de proteína G acoplada ao receptor quinase (GRK2 e GRK4) na entrada de YFV.

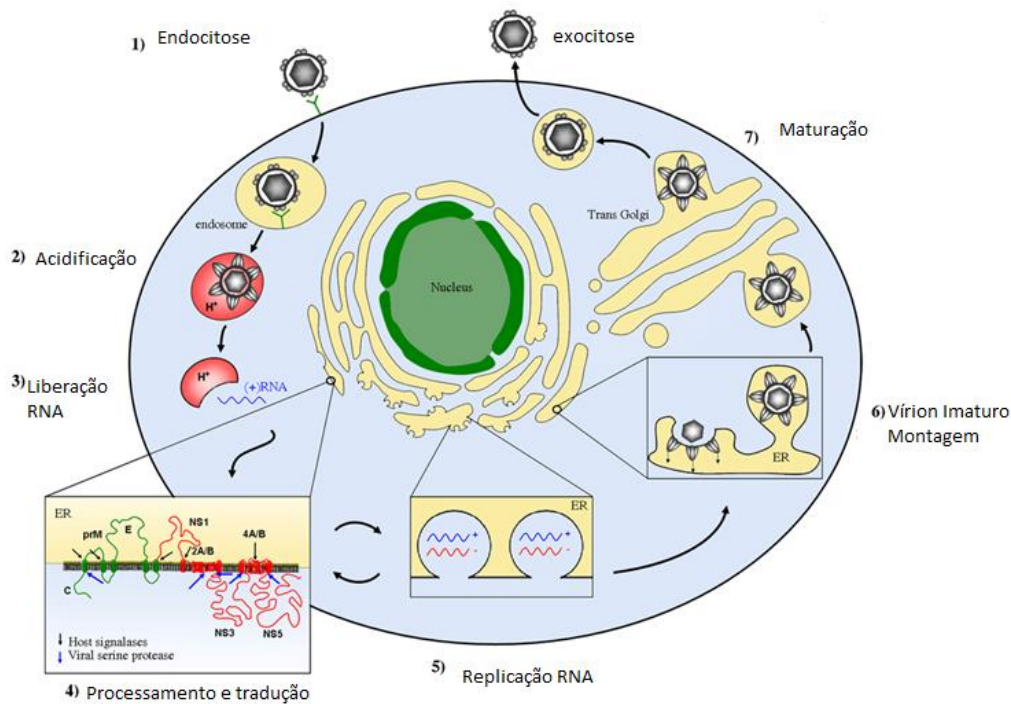


Figura 2: Ciclo replicativo dos Flavivirus. (1) Entrada viral por endocitose mediada por receptor, (2) Acidificação: diminuição do pH endossomal, fusão de membranas, (3) Liberação do RNA viral, (4) Poliproteína viral formando complexos replicativos nas membranas do retículo endoplasmático, (5) Formação de RNA viral intermediário, fita negativa serve de molde para produção de RNA polaridade positiva, (6) Formação de vesícula brotando do retículo endoplasmático, (7) Os vírions são encaminhados para o complexo de Golgi, onde sofrem maturação, (8) O vírus maduro é liberado por exocitose. (Fonte: Fernandez-Garcia et al. 2009)

A replicação do RNA acontece no citoplasma em complexos de replicação associados a membranas perinucleares, a partir da síntese de um RNA intermediário de polaridade negativa, o qual serve de molde para produção de RNA viral (GARDNER e RYMN, 2010). Além do RNA genômico (RNAg), *Flavivirus* produzem RNA subgenômico (sfRNA) formado a partir da degradação incompleta de RNAg de região 3'UTR mediada por enzima exonuclease XRN1 (PASTORINO et al. 2010).

A maturação do vírus ocorre em membranas intracelulares e os vírions brotam a partir do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, dentro de vesículas citoplasmáticas, as quais se fundem com a membrana plasmática liberando as novas

partículas virais ao meio extracelular por exocitose (FERNANDEZ-GARCIA et al. 2009).

1.4 Processamento de RNA

Em células eucarióticas, a molécula de RNA produzida por transcrição sofre um processamento constituído por modificações covalentes em suas extremidades e remoção de sequências de íntrons, que são descartados do transcrito de RNA pelo processo de splicing. Íntrons são sequências não-codificantes presentes no DNA que intercalam os éxons, que são regiões codificadoras.

O processamento ocorre assim que o transcrito está sendo formado: a extremidade 5' recebe a adição de um capeamento e a 3' uma cauda poli-A (poliadenilação). Estas modificações são importantes para a célula distinguir o mRNA de outros tipos de RNAs, bem como, se a molécula foi devidamente processada (BLACK, 2003).

Depois do processamento e da retirada dos íntrons catalisados no precursor de pré-mRNA, o mRNA maduro associado com proteínas é exportado do núcleo para ser traduzido em proteína no citoplasma (ALBERTS et al. 2001).

Os íntrons foram descobertos no final da década de 70 baseados na comparação de sua presença no DNA e na ausência no RNA mensageiro, produto da transcrição do DNA. Poucos genes de DNA bacteriano, archae e bacteriófagos contém íntrons, sendo mais comuns em eucariotos. Geralmente nestes organismos, estas regiões são mais longas que os éxons, entretanto, o número, tamanho e distribuição podem variar nos organismos (DEUTSCH e LONG, 1999; AST, 2004).

Até o início da década de 90, não se atribuíam funções aos íntrons. No entanto, sabe-se que RNAs não-codificantes consistem de um grupo diverso de curtas moléculas, incluindo miRNAs, siRNAs e estão envolvidas em um gama de processos de regulação dentro do núcleo e citoplasma (ZAMORE e RALEY, 2005; CARNICI et al. 2008). Diversos estudos têm correlacionado positivamente o número de RNA não-codificante com a complexidade dos organismos (AMARAL e MATTICK, 2008).

Os íntrons de RNA também podem exercer função catalítica e realizar o auto-splicing. Esta classe de íntrons é dividida em íntrons de grupo I e II. O primeiro grupo é caracterizado por uma estrutura secundária altamente conservada e pelo seu mecanismo de excisão em que os íntrons catalizam diretamente as duas reações de

transesterificação, e está presente nos genes do rRNA nuclear de protozoário (CECH e BASS, 1986).

O íntron do grupo II também é autocatalítico e possui mecanismo de excisão semelhante aos íntrons que são removidos por maquinaria de ribonucleoproteínas, o spliceossomo (**Figura 3**). São encontrados em alguns genes rRNA, tRNA de mitocôndrias, cloroplastos, genomas de fungos, plantas, protistas, anelídeo e bacteriófagos (LAMBOWITZ e ZIMMERLY 2004; TORO *et al.* 2007; VALLE`S *et al.* 2008).

Devido as características dos íntrons do grupo II, incluindo o seu auto-splicing e o fato de que alguns se dividem em dois ou mais segmentos funcionalmente reassociados, estudos sugerem que o spliceossomo e o retrotransposon em eucariotos evoluíram deste grupo (KEATING, *et al.* 2010; LAMBOWITZ e ZIMMERLY, 2010).

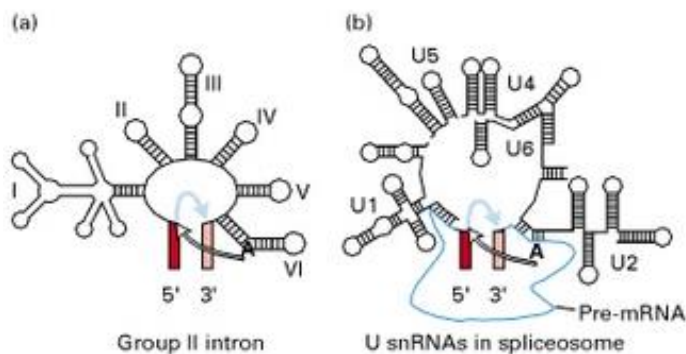


Figura 3: Comparação das estruturas secundárias de auto-splicing do grupo II com de ribonucleoproteínas presentes no spliceossoma. (a) Intros do grupo II e estruturas secundárias (b). Maquinaria do spliceossoma a primeira reação de transesterificação é indicado por setas pretas, a segunda reação, por setas azuis. Fonte: Sharp, 1991, *Science* 254:663.

1.5 Mecanismo de Splicing

Eucariotos superiores desenvolveram mecanismos complexos e altamente dinâmicos para catalisar o splicing. Este evento, dependendo do organismo, pode requerer a participação de mais de 200 proteínas (WILL e LUHEMANN 2006).

As principais moléculas catalizadoras do mecanismo de splicing são cinco pequenas moléculas de RNA nuclear, snRNAs, (U1, U2, U4, U5 e U6) que são associadas com subunidades protéicas para formar pequenas ribonucleoproteínas (snRNPs) que formam o cerne do spliceossomo (NILSEN, 2003).

A correta excisão de íntrons do pré-mRNA é essencial para a tradução do mRNA maduro em proteínas. Portanto, erros ou mutações que alteram os sítios de splicing são frequentemente a causa de diversas doenças. Krawczak, et al (1992) apontam que aproximadamente 15% das mutações que causam doenças genéticas afetam o splicing do pré-mRNA.

Outra característica importante do splicing é a flexibilidade. Alguns éxons sofrem o splicing constitutivamente, ou seja, eles estão presentes em cada mRNA produzido a partir de um dado pré-mRNA, enquanto que, alguns têm alterações na utilização do sítio de splicing, para gerar formas variáveis de mRNA, (MATLIN et al. 2005; BLENCOWE, 2006).

O splicing alternativo é predominante em eucariotos superiores e aumenta o número de proteínas expressas a partir de um único gene, sendo um importante mecanismo para gerar diversidade proteica (NILSEN e GRAVELEY, 2010).

Dois tipos de spliceossomo coexistem na maioria dos eucariotos: o spliceossomo catalizado pelas snRNAs (U1, U2, U4, U5, U6), também conhecido como spliceossomo dependente de U2, e, um menos abundante, o spliceossomo dependente de U12 (PATEL e STEITZ, 2003).

Este spliceossomo de frequência menor possui classe de íntrons que não possuem região com sequências consenso. A excisão é catalisada por quatro snRNPs, U11, U12, U4atac e U6atac, que são diferentes mas funcionalmente análogos aos snRNAs da maquinaria de splicing dependente de U2 (HALL e PADGETT, 1994; VALADKHAN, 2010).

Íntrons de tipo U12 são encontrados em plantas e em metazoários incluindo vertebrados, insetos e cnidários (BERGE et al. 1998). Embora existam poucos desses íntrons no genoma das espécies citadas, a sua persistência durante praticamente toda a evolução de metazoários indica que possuem origem antiga e importante função celular (PATEL e STEITZ, 2003).

1.6 Spliceossomo

A montagem do spliceossomo requer diversas redes de interações ordenadas de RNA-RNA e RNA-proteínas com importantes mudanças estruturais durante sua ativação catalítica (BROW, 2002). Três pontos são críticos para o início da montagem

do spliceossomo: o sítio 5', o ponto de ramificação e o sítio 3' presentes em cada íntron. Estes representam sinais de reconhecimento dos snRNAs, através de pareamento de bases, para a delimitação da montagem da maquinaria (WILLE LUHRMANN, 2007).

Inicialmente, o complexo U1 snRNP é associado com o sítio 5' de splicing, bem como fatores não-snRNPs. Em metazoários, estes incluem a U2AF e a SF1 que interagem com polipirimidina e o ponto de ramificação no sítio 3' do splicing (**Figura 4**) (KONARSKA, et al. 2006).

Em seguida, a molécula U2 snRNP associa-se ao ponto de ramificação, formando um complexo. Após a ligação estável de U1 e U2 ao pré-mRNA, são recrutados para os sítio 5' as snRNPs U4, U5, U6, que estão pareadas formando um complexo tri-snRNP.

Após associação do tri-snRNP, ocorrem diversos rearranjos que desestabilizam a interação U4/U6, incluindo o deslocamento U1 na extremidade do sítio 5' por U6. Nesta etapa, a U1 e U4 são liberadas da maquinaria do spliceossomo.

Além disso, uma rede de emparelhamento extensa de base é formada entre U6 e U2, que justapõe ao sítio 5' e o ponto de ramificação para o primeiro passo de splicing. Participam também nesta etapa as proteínas, Prp28, Brr2 e Snu114, que catalizam a estabilização dos rearranjos de RNA-RNA e RNA-proteínas e o correto pareamento de bases. Também, realizam o acoplamento da energia de hidrólise do ATP à maquinaria do spliceossomo (WILLE LUHRMANN, 2011).

Na sequência catalítica, a proteína Prp2 da família RNA helicase gera um complexo que catalisa o primeiro dos dois passos de splicing. Isto produz um novo complexo, que, por sua vez, catalisa o segundo passo de splicing envolvendo o ataque nucleofílico na junção 3' do 'splicing pelo 3'OH do exon 5' liberado no primeiro passo.

Em seguida, a proteína Prp16/H-ATPase promove mudanças necessárias para o segundo passo. É proposto que a Prp16 desempenhe um papel central na transição conformacional do primeiro passo para o segundo, funcionando como um marcador temporal entre as etapas do splicing (NILSEN e GRAVELEY, 2010).

Participam também, após a Prp16, as proteínas Prp18, e Prp22 auxiliando o alinhamento dos grupos reativos responsáveis pela segunda etapa (SMITH et al. 2008). A Prp22 também é necessária para a liberação dos íntrons a partir do pré- mRNA (SCHWER, 2008). Nesta etapa também participa a proteína hSlu7 que atua da escolha de sítos de splicing 3' porém, não é essencial para o splicing . (CHUA e REED, 1999).

Após a catálise da segunda etapa do splicing, os complexos tri-snRPNPs (U2, U5 e U6) permanecem unidos aos íntrons excisados do pré-mRNA. Os éxons se unem, formando o mRNA maduro.

A Prp43 é recrutada para catalisar a dissociação do spliceossomo e liberação das snRNAs que ficarão disponíveis para participarem de novos ciclos de splicing (TSAI et ai. 2007).

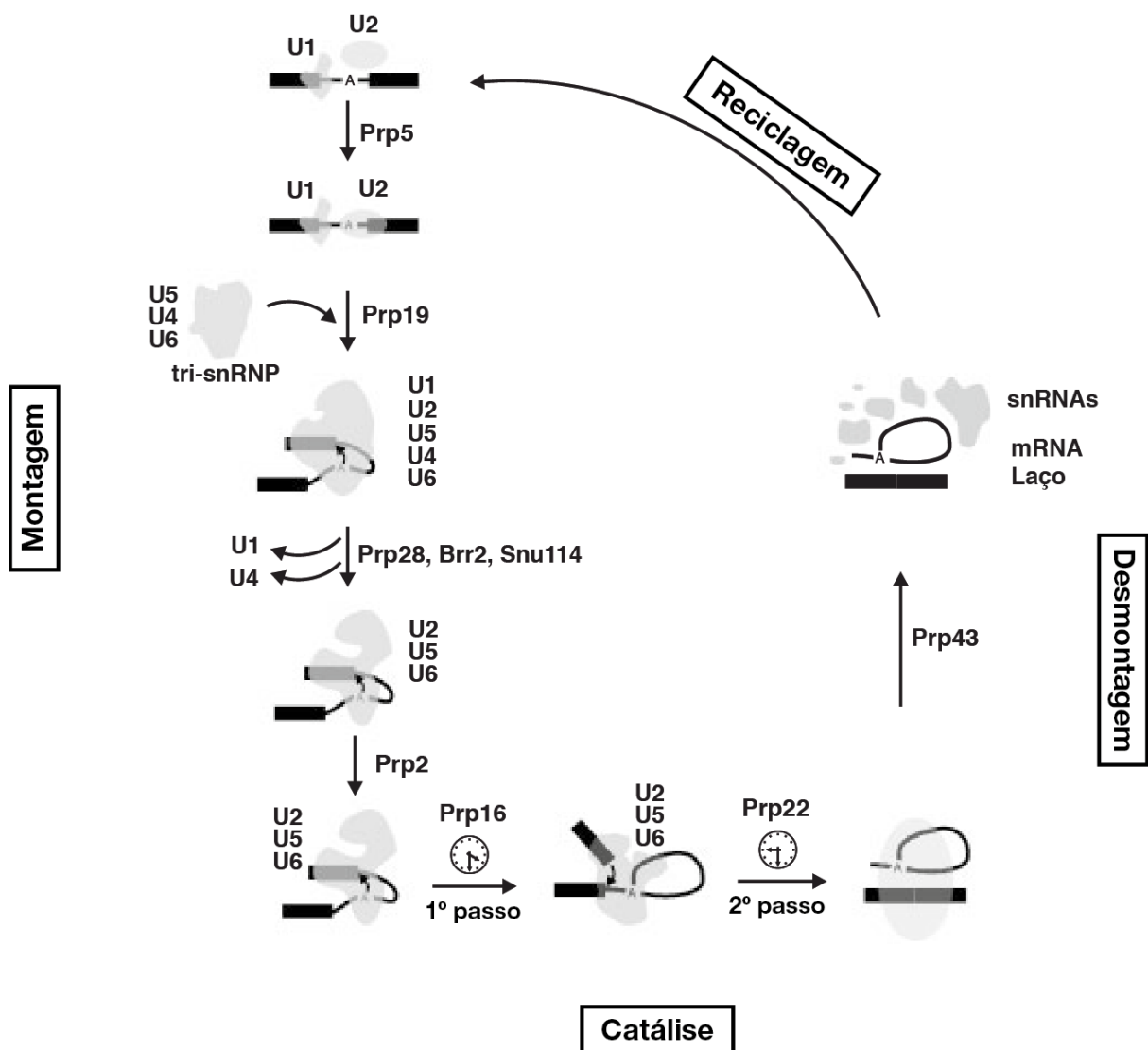


Figura 4: O ciclo de spliceossomo. O pré-mRNA é mostrado em preto, e a localização do ponto de ramificação é marcada por um A. Os éxons são mostradas como retângulos sólidos e o introns é representado por uma linha fina. O spliceossoma complexos e snRNPs são mostradas em cinza. Os principais passos de ciclo spliceossomo, catálise, montagem, desmontagem e

reciclagem estão marcados no gráfico. As principais etapas de revisão de spliceossoma ciclo são marcadas por sinais de relógio. Fonte: Valdkhan e Jaladat, 2010.

1.7 Splicing X Vírus

Diversos vírus que infectam as células eucarióticas têm evoluído para explorar splicing de RNA como forma de diversificar sua expressão gênica e, assim, aumentar seu potencial proteômico, bem como utilizar o splicing como um mecanismo de regulação pós-transcricional de seus genes.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) utiliza numerosos sítios de splicing 5' e 3' de uma forma temporal para gerar um número estimado de 40 mRNAs diferentes em uma célula infectada (PURCELLI e MARTIN, 1993; SCHWARTZ et al. 1990).

Em papilomavírus, o splicing de RNA alternativo está associado com o ciclo de vida do vírus e depende da diferenciação do estado de queratinócitos do hospedeiro (ZENG, 2004).

O vírus Epstein-Barr (EBV) codifica uma proteína nuclear durante o ciclo lítico essencial para sua replicação. A SM é uma proteína que se liga à RNA e aumenta a expressão de genes de EBV através da estabilização do mRNA e facilitando a exportação nuclear. Além disso, influencia no splicing celular do hospedeiro (VERMA, et al. 2010).

O herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1) codifica proteína ICP27, um regulador multifuncional da expressão do gene durante a infecção. A ICP27 é altamente conservada em herpesvírus, com pelo menos 30% de identidade de aminoácidos entre a família Herpesviridae (CHEN, et al. 2005). Diversas interações entre ICP27 e proteínas celulares têm sido descritas, incluindo fatores de splicing, proteínas de exportação e RNA polimerase II (SANDRI-GOLDIN, 2008; SMITH, 2005). A ICP27 também tem sido associada a funções no citoplasma interagindo com poliribossomos, fatores de tradução eIF3, eIF4G e proteína de ligação poli(A), sugerindo um papel importante na tradução do mRNA viral (FONTAINE-RODRIGUEZ e KNIPE, 2008; LARRALDE et al. 2006).

Outro fator importante na evolução de vírus é a tendência de desenvolver mecanismos para controlar ou desativar o transporte nucleo-citoplasmático de células hospedeiras, através do Complexo Poro Nuclear (NPC). Vários vírus podem interferir

em vias de importação ou de exportação nuclear, interagindo ou degradando receptores do transporte celular (PETERSEN, et al. 2001; PARK, et al. 2010).

Malik et al (2012) descreveu a interação direta da proteína ICP27 de HSV-1 com receptor Nup62 do Complexo Poro Nuclear, inibindo vias de transporte de exportação nucleo-citoplasma do hospedeiro. A Nup62 está localizado no centro do NPC e geralmente é alvo para muitos vírus (FONTOURA, et al. 2005).

Em *Flavivírus* as funções de todas as proteínas virais ainda não foram totalmente estabelecidas. Sabe-se que as proteínas estruturais são incorporadas ao vírion durante a maturação e liberação viral e as proteínas não-estruturais são responsáveis pela replicação nas células infectadas, bem como envolvidas em mecanismos antivirais (MONATH, 2001; COSTA et al. 2013).

A proteína não-estrutural NS5 de *Flavivirus* é uma das proteínas mais importantes do complexo de replicação e podem interagir com um amplo grupo de proteínas do hospedeiro para a replicação do vírus. Estudos recentes demonstraram a interação de proteínas virais com proteínas celulares envolvidas na splicing (LE BRETON et al. 2011, MAIRIANG et al, 2013).

NS5 é também identificada no núcleo de células infectadas por alguns *Flavivirus*, incluindo YFV e DENV, demonstrando que NS5 pode apresentar funções no núcleo celular, como a interação e a modificação de proteínas e funções celulares (RAWLINSON et al. 2007).

Madrid, 2007 identificou interação de NS5 de YFV com a proteína hSlu7, também foram detectadas as interações com as proteínas SNF5, p54, eIF3, MIF, entre outras, que estão envolvidas na remodelação de cromatina, fator de transcrição multifuncional, fator de tradução e regulação de resposta imune e inflamatória, respectivamente.

A proteína hSlu7 está envolvida com processos de splicing alternativo e é importante para o segunda etapa catalítica do spliceossomo (CHUA e REED, 1999). Esta proteína de localização nuclear transloca para o citoplasma após a infecção de YFV (GAVIOLLI, 2011).

BRONZONI et al (2011) identificou interação de NS5-U1A, uma proteína envolvida na primeira etapa catalítica do splicing celular e poliadenilação.

Em ensaio de duplo híbrido, foi observado uma gama de proteínas humanas interagindo com proteínas virais NS3 e NS5, entre elas proteínas do complexo ribonucleico HNRNPF, e HNRPH3 (LE BRETON et al. 2011).

Interações de proteínas virais e celulares, interferência na fosforilação proteica e alteração em vias de transdução de sinal podem atuar direta e indiretamente em mecanismo de regulação de sítio de splicing, promovendo mudanças no quadro de leitura e possíveis alterações em proteínas celulares. Apesar de identificados diversas interações não há descritos na literatura para *Flavivírus* o impacto destas no splicing celular.

2. JUSTIFICATIVA

A Febre Amarela é uma doença com relevante taxa de letalidade e representa um problema de saúde pública. Não existe tratamento específico para a doença, apenas tratamento suporte ao paciente para as manifestações da doença e suas complicações.

Além disso, diversas combinações de fatores estão associados com o ressurgimento da Febre Amarela: epizootias recentes; a exposição de uma população susceptível humana não imunizada; condições favoráveis para a alta densidade e expansão de vetores; surgimento de uma nova linhagem genética e circulação de pessoas.

Estudos da biologia e do comportamento viral sobre o controle exercido pelo vírus na maquinaria celular do hospedeiro são extremamente importantes, uma vez que, a replicação dos *Flavivirus* ainda não é completamente compreendido.

Diversas interações entre o RNA viral, proteínas virais estruturais e não estruturais e proteínas celulares indicam que estas podem causar efeitos na sinalização celular sobre o controle de splicing alternativo, transporte núcleo citoplasma e controle de respostas imunológicas.

Assim, uma abrangente compreensão dos mecanismos em que os vírus podem mediar ou exercer sinalização para regular splicing celular são importantes e oferecem novos *insights* sobre a biologia do vírus de Febre Amarela e sua patogenicidade.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito da infecção de YFV-17DD na modulação de splicing celular alternativo dependente de hSlu7.

3.1 Objetivos específicos

Confirmar interação de NS5 de YFV com proteína celular hSlu7 por imunoprecipitação;

Verificar a influencia da infecção por YF na expressão de genes reporters de splicing (IL7r, ADAR2, FGFR2 e XBP-1);

Verificar o papel de superexpressão de hSlu7 na replicação viral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Células e vírus

As células Embrionárias Humanas de Rim (Hek-293T), carcinoma hepatocelular humanas (HepG2) e células de rim de *Macaca mulatta* LLCMK2 foram cultivadas em Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 100U/ml de penicilina, e 100U/ml de estreptomicina. Células Vero E6 foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100U/ml de penicilina, e 100U/ml de estreptomicina. As células foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. O Vírus da Febre Amarela cepa 17DD (Fiocruz, Brasil) foi multiplicado em células C6/36. Para tanto, a monocamada celular com aproximadamente 90% de confluência, foi infectada com YFV 17DD por 1 hora a 28 °C e, posteriormente, incubada por sete dias com meio de manutenção Leibovitz-15 acrescido de 1% SFB. Após período de incubação, o sobrenadante foi alíquotado e armazenado a -80 °C para a determinação de título viral.

O título viral foi em linhagem celular Vero E6 por método de formação de placa de lise e os valores foram expressos em Unidades Formadoras de Placa por mL (PFU/mL).

4.2 Co-imunoprecipitação

Co-imunoprecipitação da pEGFP-hSlu7 com a proteína viral não-estrutural NS5, foi realizado conforme metodologia descrita por Chua e colaboradores (2004), com algumas modificações. Células Hek-293T foram cultivadas em placa de 6 wells e transfectados com 4 µg do plasmídeo pEGFP-hSlu7 utilizando *TurboFect* (Fermentas), de acordo com recomendação do fabricante. Após 24 horas de cultivo, as células foram infectadas com MOI de 5 de YFV, por 1 hora, a 37°C, 5% de CO₂, e posterior adição de meio de manutenção. Após 24 horas as células foram lavadas com PBS 1X, e ressuspendidas e incubadas em tampão de Lise NP-40 (50 mM Tris, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5mM EDTA, 50 mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1% Nonidet P40, 0.02% NaN₃, 1 mM PMSF e inibidor de protease) por 30 min a 4°C. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 12.000g, durante 10 min, a 4 °C e o extrato celular submetido a precipitação. O lisado celular foi incubado com *dynabeads Protein G* (Invitrogen)

ligadas ao anti-GFP produzido em camundongo, concentração 1:1000, segundo recomendação do fabricante . O precipitado imune foi separado em gel 12 % SDS-PAGE, a 100 V por aproximadamente 3 horas em cuba vertical/ Amersham Biosciences) e identificados por *Western Blot*. As proteínas separadas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose PVDF, em 25 V, 300 mA por 1:40 h. A membrana permaneceu em solução de bloqueio (PBS 7,4 acrescidos de 0,1% de Tween-20 e 10% de leite em pó) sob agitação branda por 1 h em temperatura ambiente. Foi realizado um WB com anticorpo primário anti-GFP, diluição 1:1000 (Sigma), produzido em camundongo e outro WB com anticorpo primário anti-NS5 de YFV (gentilmente cedido pelo Dr. Charles Rice, Rockefeller) na diluição 1:1000 produzido em coelho. Os anticorpos primários foram incubados overnight a 4 °C. Após incubação as membranas foram submetidas a três lavagens de 5 minutos, com PBS 1X, acrescido de 0,3 % de Tween, e em seguidas incubadas com anticorpo secundário (anti-camundongo e anti-coelho com as membranas respectivas) conjugado à peroxidase em solução de bloqueio, a temperatura ambiente por 1 hora. Após incubação as membranas foram submetidas a revelação com reagente quimioluminescente (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham. GE Healthcare).

4.3 Ensaio de splicing alternativo de replicon pEGFP-C3-ADAR2

Inicialmente o plasmídeo pEGFP-C3-ADAR2 cedido gentilmente por Dr. Gil Ast, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Israel, foi transformado em *E. coli* cepa DH5 α por técnica celular quimiocompetente utilizando Cloreto de Cálcio e choque térmico. A cultura transformada foi semeada em placas contendo meio LB sólido, com o antibiótico kanamicina e incubada por 16 horas a 37°C. As colônias resistentes a kanamicina foram selecionadas e inoculadas em meio LB líquido contendo antibiótico citado para expansão clonal. A cultura foi centrifugada a 7.500g, por 15 minutos e o *pellet* foi utilizado para extração de DNA plasmidial, segundo protocolo em *in house* ou por kit QIAGEN Plasmid Maxi, de acordo com instruções do fabricante. O DNA plasmidial obtido foi quantificado por espectrofotômetro e em seguida, sequenciados para confirmação.

Células Hek-293T foram tripisinizadas e semeadas em aproximadamente 1,0 $\times 10^5$ em placas de 6 poços. Quando a monocamada atingiu 60% de confluência, as células foram transfectadas com *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) na razão de 1:2 (DNA plasmidial: lipofectamina) em meio DEMEM sem soro, segundo recomendações do

fabricante. Após 24 horas, poços em duplicata foram infectadas com YFV 17DD, MOI de 5. Células transfectadas sem infecção representaram o controle negativo e células transfectadas submetidas a estresse por irradiação UV-C 0.3 J cm^{-2} o controle positivo.

A extração de RNA total utilizando reagente trizol foi realizada 6h e 12h após infecção e quantificado por espectrofotômetro. A partir de $1 \mu\text{g/mL}$ de RNA foi realizado tratamento com 1U DNaseI previamente à transcrição reversa. O cDNA foi sintetizado usando Oligo(dt) e Kit Superscript III First Strand (Invitrogen). Para verificação relativa dos níveis de expressão de isoformas de mRNA ADAR2 foi realizado Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), Kit PCR SuperMix. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% juntamente com o controle endógeno α -Tubulina e analisados por programa de imagem *Kodac Molecular Imaging Software*. A porcentagem de exclusão do exon 8 foi calculada conforme fórmula: $^{\circ}\text{C}$ (exclusão / (exclusão+inclusão) X100.

4.4 Avaliação do efeito da superexpressão transiente de hSlu7 na replicação do vírus da Febre Amarela em cultura celular

4.4.1 Superexpressão de hSlu7

A superexpressão transiente de pEGFP-hSlu7 foi realizada em células Hek-293T cultivadas em placas de 6 poços, com aproximadamente 60 % de confluência a monocamada foi transfectada com plasmídeo pEGFP-hSlu7 em concentrações crescentes de $0,5 \mu\text{g/mL}$ a $4,0 \mu\text{g/mL}$ (**Figura 5**), após 24 horas as células foram infectadas com YFV17DD MOI de 5. Após adsorção do vírus (1 hora), o meio de cultura foi retirado e a monocamada foi lavada com PBS1x e adicionados meio DMEM com 1 % de SFB. Células infectadas sem transfecção e transfectadas com plasmídeo pEGFP vazio representaram controles positivo e negativo, respectivamente. O plasmídeo pUC21a foi transfectado junto para equivalência molar. O sobrenadante foi recolhido após 24 horas de infecção para detecção de RNA viral por qRT-PCR. As células foram lisadas com tampão NP-40 para verificar a expressão da proteína. O lisado celular foi recolhido, centrifugado para retirada de debris, a $12000g$, por 10 minutos, a 4°C , dosados por método de Bradford. Em seguida, eluídos em SDS loading buffer (Tris-HCl $0,125 \text{ M}$, SDS 4%, glicerol 20%, 2-beta, mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol $0,001 \text{ M}$). As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10% , a 120 V

por 2 horas esubmetidas a WB com anticorpo primário policlonal anti-hSlu7 (Abcan) produzido em camundongo, diluído 1:500 e anticorpo secundário conjugado à peroxidase, 1:1000.

pEGFP-hSlu7	pUC21a	Total
0,5 ug	3,5 ug	4,0 ug
1,0 ug	3,0 ug	4,0 ug
2,0 ug	2,0 ug	4,0 ug
3,0 ug	1,0 ug	4,0 ug
4,0 ug	0	4,0 ug

Figura 5: Concentração de plasmídeos transfetados
Para análise da superexpressão de hSlu7 na replicação de YFV.

4.4.2 qRT-PCR para avaliação da replicação de YFV

O RNA viral foi extraído a partir de 140 uL do sobrenadante recolhido do ensaio de superexpressão de hSlu7 pelo *Qiamp Viral RNA Kit* (Qiagen), de acordo com recomendações do fabricante.

As reações foram realizadas com Kit *SuperScriptIII® Platinum® Syber Green One-Step qRT-PCR* (Invitrogen), contendo, 5 uL de RNA, 0,5 uL de *SuperScriptIII Platinum Taq Mix*, 12,5 uL de *SYBR Green*, 0,5 uL ROX, 1 uL de *primer NS5YFSEQ 1663F* (5'-TTGAACTACATGAGCCCACATC-3') e *NS5YFSEQ1828R* (5'-CATAAGTCACTACCTGCCCG-3') a 10uM cada, e água para completar volume total de 25 uL. As reações foram realizadas em *StepOnePlus Tempo Real PCR System* (Applied Biosystem) utilizando *MicroAmp Fast Optical 48 Well Reaction Plate*, submetidas a 50°C por 20 min, 95°C por 5 min, seguidas de 40 ciclos: 95°C por 3 seg, 60° e adicionado curva de *melting*. A curva padrão foi realizada com a amostra vacinal de YFV 17 DD contendo 10¹, 10³, 10⁵, 10⁷ PFU/mL. Foram realizados ensaios em triplicata e analisados por teste ANOVA Prism 8.0.

4.5 Ensaio de splicing alternativo de XBP-1

Células Hek-293T foram cultivadas em placas de 6 poços por 24 horas para atingirem confluência de 60 %, em seguida, infectadas com YFV 17DD, MOI de 5. O RNA total foi extraído com trizol, de acordo com instruções do fabricante, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h, após infecção e quantificado por espectrofotômetro. A partir de 1 μ g/mL de RNA foi realizado tratamento com 1U DNaseI previamente à transcrição reversa. O cDNA foi sintetizado usando Oligo(dt) e Kit Superscript III First Strand (Invitrogen). Para verificação relativa dos níveis de expressão de isoformas endógenas da proteína XBP-1 (XBPU-1/ XBP-1) foi realizado Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), Kit PCR SuperMixer, com primer específicos. Células não infectadas e a expressão gênica constitutiva de β -Actina foram utilizadas como controle.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3,5% e a expressão das isoformas quantificadas utilizando programa de imagem *Kodak Molecular Imaging Software*.

4.6 Ensaio de alteração de splicing de replicon de IL7R

Os plasmídeos foram gentilmente cedidos por Dr. Mariano A. Garcia-Blanco, Duke University: pI-12 codifica isoforma s-ILR7 considerado plasmídeo controle, e pI-ILR7 codificando duas isoformas r-ILR7 e s-ILR7. Células Hek-293T foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 6 poços por 24h, para atingirem confluência de 60%. A transfecção dos plasmídeos foi realizada com reagente *TurboFect* (Fermentas) na razão de 1:2 (6 μ g DNA plasmidial: 12 μ l de reagente de transfecção). Após 24h, as células foram infectadas com YFV 17DD, MOI de 5. O RNA total foi extraído utilizando trizol, após 24h, e quantificado por espectrofotômetro. Em seguida, foi realizado tratamento com DNase e síntese de cDNA como descritos no item 4.2.

Para reação de PCR foram utilizados 2 μ L de cDNA, adicionadas de primers *forward* (T7) e *reverse* (Sp6), em concentração de 20 pmol, respectivamente. A expressão gênica de células não infectadas, assim como, do gene constitutivo β -Actina foi utilizada como controle.

Para verificação de isoformas os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5% e impregnados com nitrato de prata. A

expressão dos transcritos foi quantificada utilizando programa de imagem *Kodac Molecular Imaging Software*.

4.7 Ensaio de splicing alternativo de Receptor 2 de Fator de Crescimento de Fibroblasto FGFR2

Os plasmídeos, gentilmente cedidos por Dr. Mariano Garcia-Blanco, Duke University, pEGFP-N1-pGIIIcI² e pGFP-N1-pGΔΔ seguiram o mesmo plano de trabalho, citados no item 4.3.

Para avaliação deste ensaio foram produzidas células estáveis, que correspondem à expressão constitutiva do plasmídeo. HepG2 e LLCMK2 foram cultivadas em placa de 6 poços em concentração de $1,5 \times 10^5$ células por cavidade, para atingirem confluência de 60%. Após 24 horas, as células foram transfectadas com reagente *TurboFect* na proporção 2:1 (DNA: reagente de transfecção), seguindo recomendações do fabricante. Após 48 horas de transfecção, o meio de cultura foi substituído por DEMEM suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e 500 ug/mL de Geneticina (G418-Sigma) para seleção contendo *replicon*, células não transfectadas também foram tratadas com meio contendo G418. Após a morte do grupo controle, as células selecionadas foram expandidas em garrafas com meio suplementado a 10% SFB e 125 ug/mL de G418. Posteriormente congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido.

Para análise de fluorescência em FACSCalibur, células HepG2 e LLCMK2 estáveis foram cultivadas em placas de 6 poços com e sem infecção (YFV, MOI 5). Células sem o *replicon* e estáveis com o plasmídeo vazio (pEGFP-N1) foram utilizadas como controles para avaliação de autofluorescência e ajustes de voltagem e controle do ensaio, respectivamente.

As células foram ressuspensas em 500 uL de tripsina, acrescentado mesmo volume de SFB10%, centrifugadas por 1000g, lavadas em PBS 1X, submetidas a nova centrifugação e adicionados 2 mL de PBS 1X e levadas para análise de fluorescência. As amostras foram padronizadas para aquisições de 50.000 células por amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Co-imunoprecipitação de hSlu7 e NS5 de YFV

Os resultados indicam que NS5 de YFV pode interagir com hSlu7 em células de mamíferos. A figura 6 mostra eficiente imunoprecipitação de hSlu7-GFP com beads conjugadas com anti-GFP e analisados por *Western blotting* com anti-GFP e anti-NS5.

A proteína não estrutural NS5 de YFV foi precipitada nas células transfectadas com hSlu7-GFP e infectadas, e não detectada na ausência desta proteína fusionada (pEGFP). Similarmente, NS5 não foi imunoprecipitada contendo somente hSlu7-GFP.

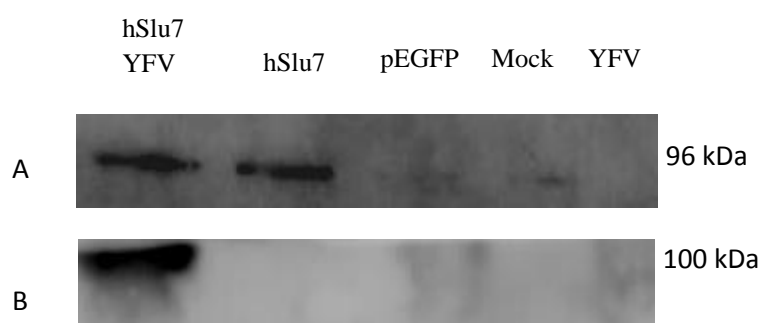


Figura 6: Co-imunoprecipitação utilizando dynabeads conjugadas com anti-GFP para imunoprecipitar pEGFP-hSlu7 e NS5 de YFV em células Hek-293T. As proteínas coimunoprecipitadas foram analisadas por WB 24 horas após infecção. (A) Lisados celulares imunoprecipitados com anti-GFP e WB anti-GFP. (B) Lisados celulares imunoprecipitados com anti-GFP e WB anti-NS5. hSlu7+YFV: células transfectadas com pEGFP-hSlu7 e infectadas, hSlu7: controle positivo, pEGFP: controle negativo, YFV: células sem transfecção e infectadas.

Estes dados confirmam ensaio anteriormente realizado por *screening* de duplo-híbrido em levedura. Neste estudo, além da identificação de hSlu7 como parceira interativa de domínio RdRp de NS5, foram identificadas mais 32 proteínas celulares, grande parte relacionadas com o metabolismo de RNA (Dissertação MADRID, 2007.).

A busca por interações entre proteínas virais e do hospedeiro podem gerar dados relevantes para melhor compreensão da dinâmica da replicação viral, bem como a modulação celular mediada pelo vírus. *Flavivirus* evoluíram para diversas interações moleculares com fatores de células hospedeiras que são prováveis para elucidar as diferenças na patogênese de infecções virais. Pesquisas com iRNA revelaram que mais

de 300 proteínas do hospedeiro afetam o resultado de infecção por WNV (KRISHNAN et al. 2008).

Estudos utilizando sistema de duplo híbrido em levedura identificaram novas interações proteína hospedeiro - Dengue. Khadka et al (2011) detectaram 139 proteínas sendo 105 do fígado humano, sugerindo que fatores do hospedeiro podem ser importantes para o ciclo de vida do vírus da Dengue. Le Breton et al (2011) identificou 108 interações envolvendo proteínas humanas e as proteínas NS3 e NS5 de sorotipo 2.

Outro estudo realizou *screening* de proteínas virais com proteínas de mosquito gerando dados importantes na identificação e compreensão da interação entre os quatro sorotipos de Dengue e seu hospedeiro fornecendo alvos candidatos a desenho de drogas e estratégias de controle do vetor (MAIRIANG, et al. 2013).

Moraes e colaboradores (2013) identificaram interação de NS5 de YFV com fator de tradução eucariótico 3, subunidade L (eIF3L), e determinaram relevante papel na replicação viral.

IFN do tipo 1 são a primeira linha de defesa a infecção viral produzidos pelos mecanismos de resposta inata humana, e portanto, muitos vírus têm como alvo estas moléculas para estabelecer uma infecção eficiente no hospedeiro. A interação já bem caracterizada de NS5 com via de transdutor de sinal e ativador de transcrição 2 (STAT-2) leva a sua degradação e desempenha um papel importante no bloqueio e produção de IFN contribuindo para evasão a imunidade e patogênese do vírus da Dengue (ASHOUR et al. 2009; MORRISON et al 2012; GREEN et al. 2014). Proteínas não-estruturais NS2A, NS4A, NS4B também apresentaram bloqueio de via de sinalização de JAK / STAT, reduzindo a fosforilação e a translocação nuclear de STAT1, o componente chave do IFN tipo I via de transdução de sinal interferindo na indução e ativação de genes estimuladores de interferon (ISG) (MUNOZ-JORDAN, 2003).

Portanto, a identificação das interações de hSlu7-NS5 abrem possibilidades para investigação de estudos funcionais.

5.2 Avaliação splicing alternativo de pEGFP-C3-ADAR2

Para verificar se a interação de NS5 de YFV com hSlu7 causa impacto no splicing celular foi utilizado replicon da proteína ADAR2 contendo três éxons e região de afinidade para hSlu7 (**Figura 7**).

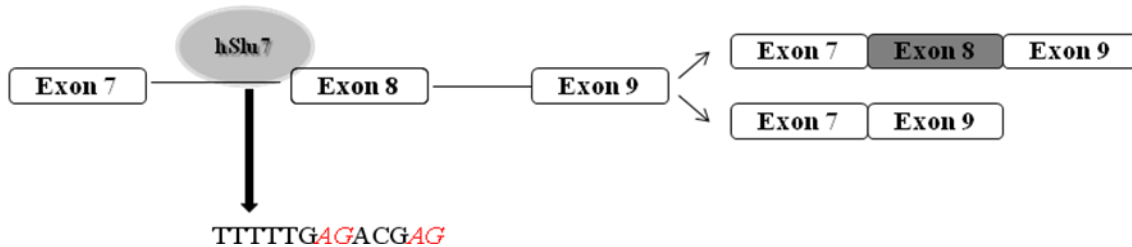


Figura 7: Representação esquemática do mini-gene ADAR2 e o possível splicing alternativo gerado pela regulação da proteína hSlu7.

A proteína hSlu7 possui localização nuclear e atua na seleção de diferentes 3'ss durante a segunda reação do splicing. Estudos indicam que submetidas a estresse essa proteína migra para o citoplasma alterando sua concentração nuclear e sugerindo papel na modulação no splicing celular (SHOMRON et al. 2005,).

Em um estudo anterior de nosso grupo (GAVIOLLI, 2011) foi demonstrado que a infecção por YF17D altera a localização subcelular de hSlu7, fazendo com que esta proteína se relocalize no citoplasma. O que levou a hipótese de que a infecção por YF seria capaz de alterar o splicing dependente de hSlu7.

Os resultados apontam para a modulação de splicing celular. Na figura 8, é possível observar que a infecção por YF17D alterou o splicing para a exclusão de exon 8 aumentando a intensidade de banda de 600pb. Os dados sugerem que em splicing dependente de hSlu7 ocorre uma regulação viral atuando sobre sítios de splicing 3' fraco.

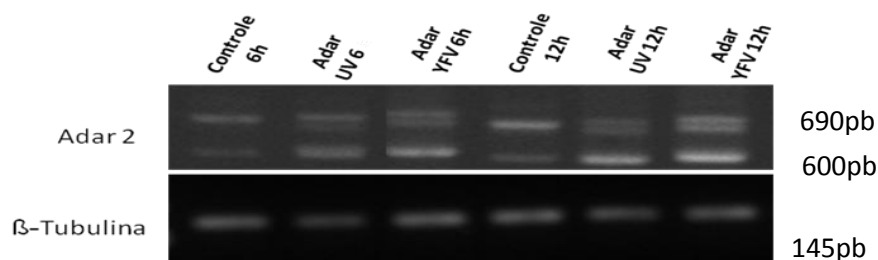


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose de 2% representando transcritos do mini-gene ADAR2. Células Hek-293T transfectadas sem infecção representam o controle células expostas

ao estresse (irradiação UV-0.3 J cm⁻²) o controle positivo e β - Tubulina foi utilizado como controle endógeno.

Na figura 9, ensaios em triplicata foram analisados e a média de exclusão do exon 8 apresentou um aumento em sua expressão, principalmente em 12h após infecção. É possível que tanto a interação NS5-hSlu7 quanto a translocação para o citoplasma possam influenciar na disponibilidade da proteína, conduzindo a diferentes seleções de 3'ss e assim gerar diferentes padrões de mRNAs.

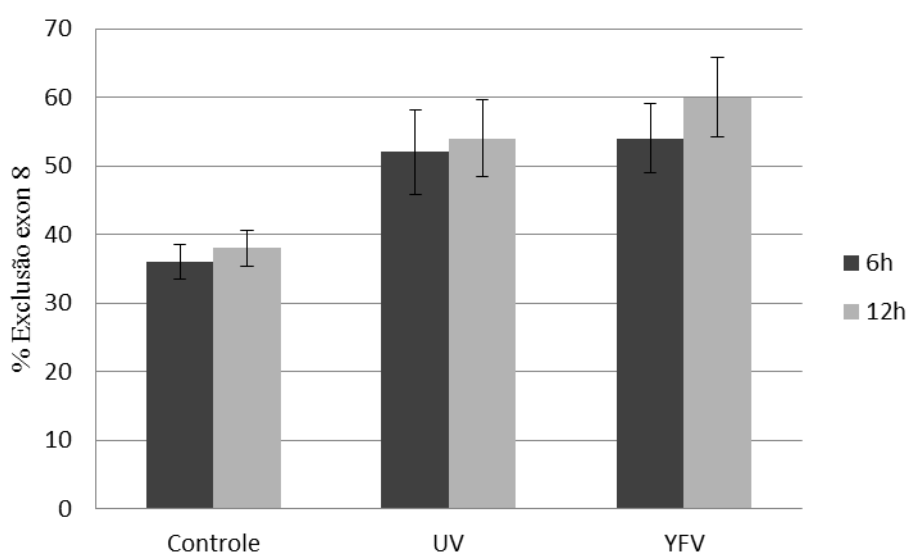


Figura 9: Análise da porcentagem da média em triplicata da exclusão exon 8 na transcrição do mini-gene ADAR 2. Controle negativo: células transfectadas sem infecção, controle positivo: células tratadas com UV.

A hSlu7 possui três domínios funcionais, um sinal de localização nuclear (NLS), um motivo dedo-zinco e uma região rica em Lisina. Os domínios NLS e dedo de zinco se sobrepõem para manter a proteína no núcleo impedindo sua exportação via CRM1. A translocação de hSlu7 é dependente de cascata N-terminal Jun-quinase (JNK) (SHOMRON et al, 2004).

A proteína NS5 de alguns *Flavivirus* utilizam a mesma via de exportação nuclear de hSlu7. Rawlinson et al 2009 determinaram que a acumulação nuclear de NS5 durante a infecção, devido à inibição CRM1, alterou a produção de vírus e diminuição

da indução do antiviral interleucina 8 (IL-8). A translocação de proteínas entre o núcleo e o citoplasma em eucariotos fornece poderoso mecanismo de regulação da expressão gênica.

Outro ponto importante é a alteração da isoforma de Adenosina Desaminases agindo em RNA 2 (ADAR2). Esta proteína catalisa a edição de Adenosina para Inosina em RNA dupla fita. Esta é lida como Guanina pelos processos celulares, gerando alterações nos códons de leitura, instabilidade no RNA, ou ainda um novo local de splicing (GEORGE, et al 2011).

ADAR2 endógeno possui 15 exons que sofrem eventos de splicing alternativo dando origem a isoformas com atividades funcionais diferenciadas. Splicing alternativo envolvido com exon 5a em humanos reduzem atividade da enzima *in vitro*, no entanto, em camundongos este evento adiciona extensão de 30 nucleotídios gerando isoforma com alta atividade de edição (RUETER et al. 1999).

A expressão de ADAR2 é ubíqua em vários tecidos, mas, em abundância no cérebro e é diferencialmente transcrito em estágios de desenvolvimento fetal, neonatos e adultos (KAWAHARA, et al. 2005). Isto sugere que em um contexto de infecção viral fatores intrínsecos do hospedeiro podem influenciar na patogênese viral.

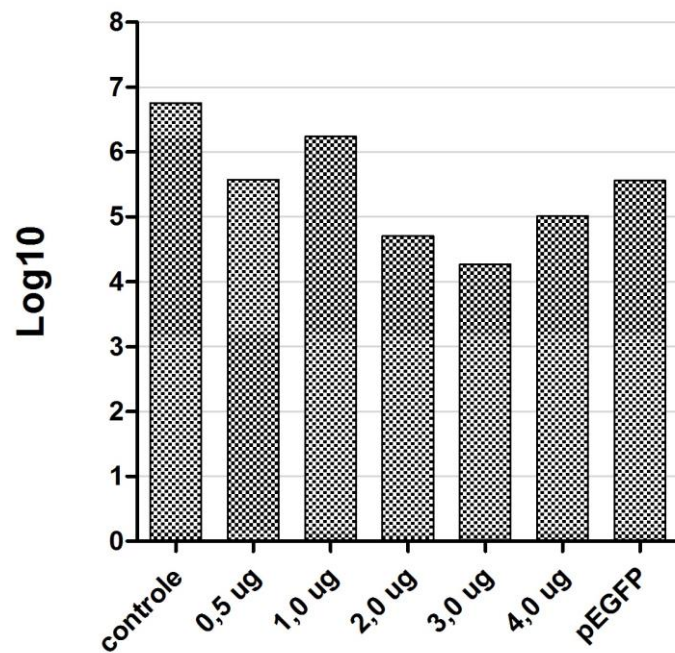
Pesquisas tem descrito que em infecções virais ADAR exerce papel diferenciado, tanto como um antiviral, quanto proviral (SAMUEL, 2011). Atividade proviral foi descrita em Hepatite Delta vírus, HIV-tipo1, Vesicular estomatite vírus e Epstein-Barr vírus. Nestes estudos é demonstrado que ADAR1 é responsável por aumentar a replicação viral por dois mecanismos: edição de RNA e inibição de proteína quinase (PKR) (GANDY, et al. 2007; IIZASA, et al. 2010; LI e SAMUEL, 2010).

O contrário é observado em Hepatite C vírus (HCV) em que a edição de A para I reduz a expressão de proteínas virais diretamente através de mutação de sequências codificantes, conseqüentemente, não há inibição de PKR, nem de bloqueio de IFN e ISGS, levando a uma atividade antiviral (SAMUEL, 2011).

5.3 Superexpressão de hSlu7 e ensaio de qRT-PCR

O efeito da superexpressão de hSlu7 na replicação de YFV está indicada na figura 10a. A carga viral diminui significativamente comparada ao controle ($p=0,001$). No entanto, é observado que a inibição da replicação viral também ocorreu na expressão do plasmídeo vazio em células infectadas. A superexpressão foi confirmada por WB (Figura 10b).

A



B

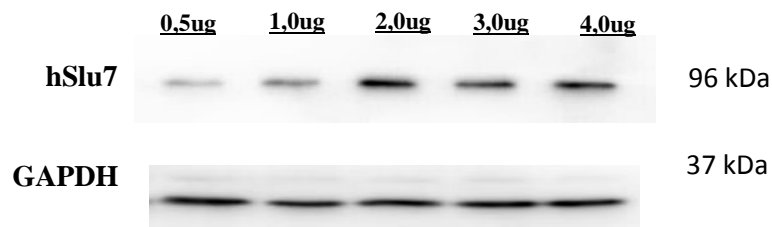


Figura 10: qRT-PCR para avaliação da superexpressão de pEGFP-hSlu7 na replicação viral. Células Hek-293t foram transfectadas com pEGFP-hSlu7 em concentrações progressivas e

infectadas com MOI de 5. O sobrenadante foi recolhido 24 após infecção para quantificação de carga viral.

A fim de avaliar se a inibição da replicação viral é devido à influência da transfecção ou da proteína hSlu7 novas análises comparando o grupo de amostras de superexpressão da proteína com o grupo controle negativo serão realizados.

5.4 Avaliação de splicing alternativo de XBP-1/IRE1- α

A proteína XBP-1 é uma das três vias sinalização de *Unfold Protein Response* (UPR) mediada por enzima inositol quinase exigida-1 (IRE1- α). A IRE1- α sofre dimerização e autofosforilação resultando em atividade de endoribonuclease que cliva e altera o quadro de leitura da proteína XBP-1 resultando em duas isoformas XBPu-1 e XBPs-1 (MIMURA et al 2012). Sob condições normais, XBP1 existe como uma isoforma unspliced (XBPu-1) já XBPs-1 é a isoforma que sofreu splicing (YOSHIDA, et al, 2001).

XBP1 splicing é essencial para a sobrevivência da célula sob condição de estresse. No entanto, o estresse RE em longo prazo induz apoptose. A transcrição da proteína XBP-1 é uma resposta adaptativa que regula a transcrição de genes responsáveis pela degradação e pelo dobramento de proteínas.

A avaliação da expressão gênica de isoformas de mRNAs da proteína *transcription factor X-box-binding protein 1* (XBP-1) está demonstrada na figura 11. A modulação em resposta a infecção viral por YFV apresentou uma inclusão progressiva de XBPs-1 em relação ao tempo de infecção (**Figura 12**).

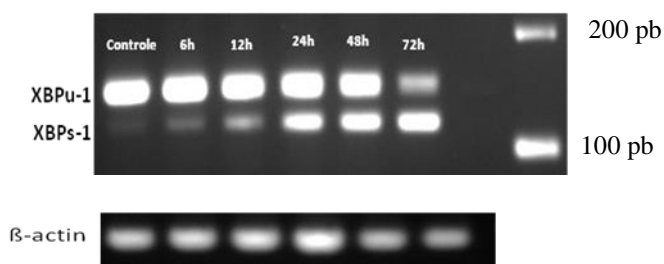


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 3,5 % com isoformas de mRNAs de XBP-1 endógenos detectados por RT-PCR. Isoforma XBPu-1 foi observado como uma banda de 152 pb e XBPs-1 com 126 pb. Células Hek-293T sem infecção representam controle, 6 a 29 72 horas células infectadas com YFV17DD.

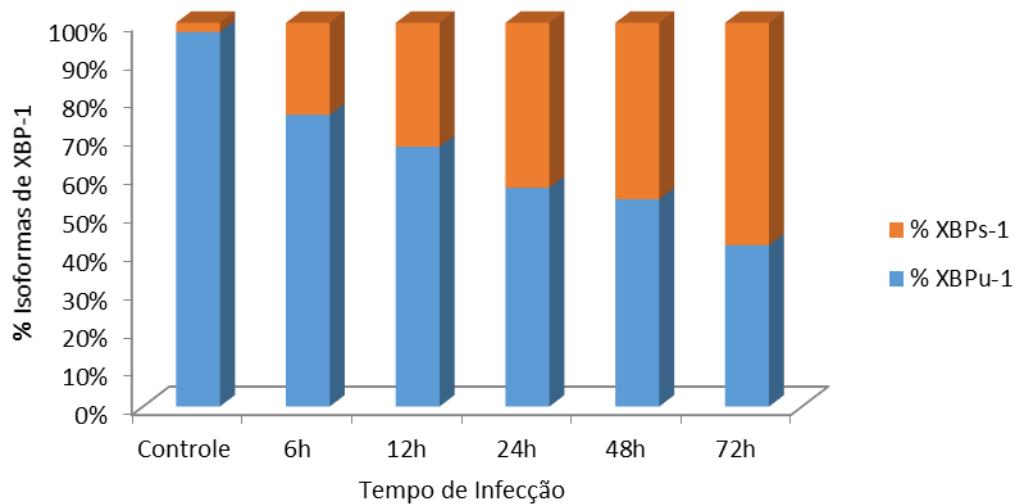


Figura 12: Porcentagem de isoformas de XBP-1. Células Hek-293T foram infectadas com YFV17DD e o RNA total foi extraído e avaliados por RT-PCR de XBP-1 endógenos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 3,5 % e quantificados por *Kodac Molecular Imaging Software*. Células sem infecção foram utilizadas como controle, extração de RNA total em 24 horas.

Ensaio em triplicata com cálculo de desvio padrão confirmaram o aumento da isoforma XBPs-1. A partir de 12h a 72h pós- infecção, a transcrição da isoforma permaneceu aproximadamente o dobro em relação à amostra controle (**Figura 13**).

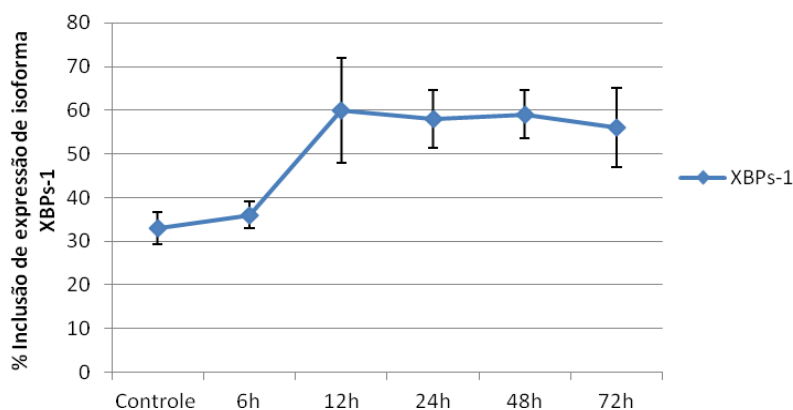


Figura 13: Análise de ensaio em triplicada de porcentagem de inclusão de XBPs-1. RNA total extraído e isoformas de mRNAs de XBP-1 endógenos foram avaliados por RT-PCR.

A expressão da isoforma XBPs-1 está relacionada com uma forte ativação de p58IPK, GRP78 e outras chaperonas. Já a isoforma XBPu-1, parece ser transcrita em níveis elevados em fase de recuperação após estresse crônico, como também tem sido implicada como um regulador fator de transcrição 6 (ATF6) (YOSHIDA et al 2001; HOSOI et al 2012).

Portanto, a infecção por YFV em células Hek-293t aumentou a regulação de transcrição de genes envolvidos no alívio de estresse do RE. Estes dados são importantes, uma vez que, as células infectadas por *Flavivirus* apresentam alterações morfológicas de proliferação e hipertrofia das membranas do RE. As três proteínas virais prM, E e NS1 são glicosiladas no RE e as proteínas não estruturais, NS2a, NS2B, NS4A, NS4B estão associadas à essa membrana (BURKE & MONATH, 2001).

Diversas pesquisas apontam para a importância da UPR e maquinaria de degradação do RE (ERAD) na patogênese viral, pois, além de causar extensa remodelação, os vírus de RNA, requerem ativa síntese de membrana para promover a infecção (WAHYU INDRA DUWI et al. 2013).

De acordo com Sriburi et al 2007, a via de XBP1 é necessária para a biogênese RE. A superexpressão de XBP1s levou a biossíntese de níveis elevados de fosfolipídios de membrana e expansão de RE. Pesquisas relacionam outras vias de UPR independentes de XBP1 como ativadoras de transcrição de fosfolipídeos, como por exemplo, via ATF6 α (BOMMIASAMY et al. 2009).

Além disso, muitos vírus se beneficiam associando-se a chaperonas localizadas no RE para contribuir no movimento intercelular e replicação do vírus. Diversas proteínas como a calreticulina, maquinaria ubiquitina e proteassoma 26S são mais comumente identificados componentes da UPR e máquinas ERAD que também podem influenciar e regular a infecção viral (VERCHOT, 2014).

Em *Flavivirus* a via XBP-1/IRE1 parece ter diferentes formas de ativação e regulação específica para cada vírus. As sinalizações de estresse no RE em infecção de JEV induzem apoptose (SU et al, 2002).

Ativação de XBP-1 na infecção de DEN-2 e JEV apresentou indução das vias de UPR e regulação de genes *trans-acting ERdj4*, *EDEM* e *p58*, envolvidos da ERAD. Neste estudo a proteína NS2B de DEN-2 e não de JEV foi um potente indutor da via XBP-1 (YU, et al. 2006).

Em HCV proteínas do envelope (E1 e E2), NS5 e membrana foram caracterizadas como indutoras da via, no entanto, a expressão do gene EDEM é reprimida. Também foi identificado estresse do RE via mecanismo depleção de Ca^{+} (BENALI-FURET, 2005).

Além de funcionar como um transdutor de tensão do RE, XBP1 também está envolvida em outros processos fisiológicos ou patológicos (LEE, 2008; KASER, 2008). Zeng et al. 2009 descreveram a participação desta proteína na manutenção e proliferação de células endoteliais. Neste estudo as duas isoformas foram altamente expressas em áreas de aterosclerose, mas não em regiões lineares da parede do vaso.

No presente estudo foi caracterizado indução da via de XBP-1/IRE-1 em células Hek-293t infectadas com YFV, com forte transcrição de isoforma XBPs-1 a partir de 12 horas após infecção até 72 horas. Estes dados sugestionam que o vírus pode utilizar sinalização celular para beneficiar e aliviar o estresse no RE e evitar apoptose.

5.5 Avaliação de splicing alternativo de replicon pI12-IL7R

Para avaliar alteração de splicing celular de receptor de interleucina-7 (IL7R) após infecção viral foi utilizado o plasmídeo pI-12IL7R. Este tem em sua construção 3 exons codificando duas isoformas, uma com inclusão do exon 6 referente ao domínio que codifica receptor ligado à membrana (r-IL7R), e outro que exclui exon 6 codificando receptor solúvel (s-IL7R), sem domínio transmembranar. Além disso, a

construção do plasmídeo, figura 14, possui sinal de poliadenilação intrônica (IPA) que influencia no sítio de escolha da maquinaria do splicing celular com participação da proteína complexo específico de clivagem de poliadenilação (CPSF1) (EVSYUKOVA et al. 2013).

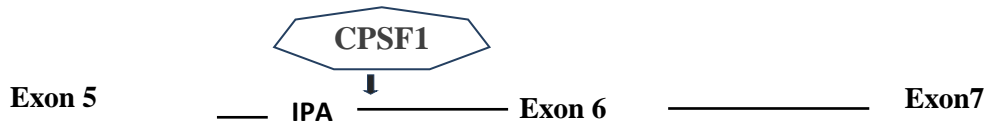


Figura 14: Representação esquemática da construção do mine-gene de IL7R. Sinal de poliadenilação poli (A) está presente no íntron, bem como sinal de clivagem. A proteína complexo específico de clivagem de poliadenilação (CPSF1) pode interagir com região intrônica e interferir com a maquinaria do spliceossoma.

Ensaios demonstraram que na presença de infecção viral foi verificado modulação para a exclusão do exon 6, (**Figura 15**).

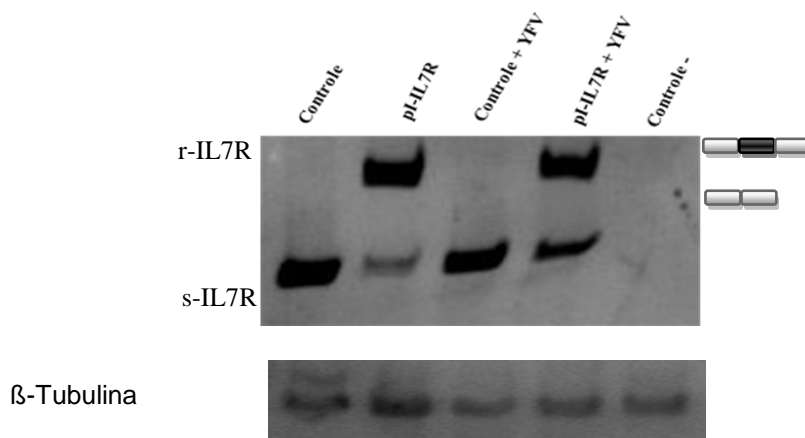


Figura 15: Ensaio Receptor Interleucina-7. Células transfectadas com plasmídeo p112 sem infecção e 24 horas após infecção: Gel de poliacrilamida 10% com coloração de nitrato de prata. Isoforma rIL7R de receptor ligado à membrana (inclusão de exon 6.) Isoforma sIL7R de receptor solúvel (exclusão de exon 6).

O splicing alternativo para o acréscimo de isoforma s-IL7R pode evidenciar que proteínas virais atuam direta ou indiretamente em elementos *cis/trans-acting* na regulação de splicing celular.

Pesquisas tem estabelecido a alta frequência entre eventos de poliadenilação intrônicos com fracos sítios de splicing 5' (TIAN et al, 2007). Evsykova et al. 2013 estabeleceram dois mecanismos para explicar efeito de CPSF1. O primeiro estaria ligado a eventos de poliadenilação competindo com U1snRNP. O segundo a montagem de complexo CPSF1, sem necessariamente ocorrer a clivagem, poderia interferir com ligação do complexo de spliceossoma (KAIDA et al 2010; BERG, et al 2012).

A interação de NS5 de YFV com U1A já foi caracterizada e portanto, a infecção viral pode ter interferência no mecanismo de montagem do spliceossoma, bem como nos eventos de poliadenilação alterando sítios de splicing e gerando formas alternativas de proteínas celulares.

IL7R são expressos em linhagens de células linfoides T e estão envolvidos em processos de manutenção e desenvolvimento celular (SAMMICHELI, et al. 2011). Seu ligante a interleucina- 7 é uma citosina envolvida nos processos de homeostase e indução de expressão de proteínas anti-apoptóticas. A ativação de IL7/IL7R regulam significativamente gene Bcl-2 prevenindo apoptose e regulando negativamente Bax, potencialmente via p53 *in vitro* (LIU, 2014).

Apesar de ambas isoformas terem afinidade elevada para se ligar a IL7 (GOODWIN et al, 1990; ROSE et al. 2009) a diminuição da inclusão do exon 6 e o aumento concomitante sIL7R poderiam levar à disfunção imunológica (MELLS et al 2011).

Mckay et al. 2008 estabeleceu relação entre o aumento da expressão de sIL7R em pacientes com Esclerose Múltipla. O decréscimo de expressão de rIL7R em células T (CD8⁺) nestes pacientes tornaram mais suscetíveis a infecções virais. Vários vírus têm sido implicados do desenvolvimento de Esclerose Múltipla, e em infecções virais crônicas (LUNEMANN et al. 2007; MULLER, et al. 2009).

Estudos mostraram que os níveis de expressão de IL7R diminuíram na infecção pelo HIV e que esta redução foi ainda maior em pacientes com avançado progressão da doença. Outro fato importante é que a infecção alterou a expressão do receptor independente da carga viral (ROSE et al. 2009; CRAWLEY et al. 2010).

Interações entre IL7R e receptor de células B progenitoras são descritas em moldar a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células B compartilhando vias de sinalização MAPK/Erk3 que participam da divisão celular (RETH e NIELSEN, 2014).

A caracterização do splicing de IL7R, sob a influência da infecção viral, podem levantar dados relevantes para o estabelecimento de uma conexão entre alteração de sinalização celular, resposta do sistema imune e patogênese viral.

5.6 Avaliação de splicing alternativo em pEGFP-FGFR2

Para caracterização de splicing alternativo de *fibroblast growth factor receptor2*(FGFR2) foram utilizados dois plasmídeos: a construção pGIIIc², contém o exon IIIc endógeno flanqueado por segmentos intrônicos e pGIIIc^{ΔΔ}, com exon IIIc e segmentos intrônicos deletados (**Figura 16**).

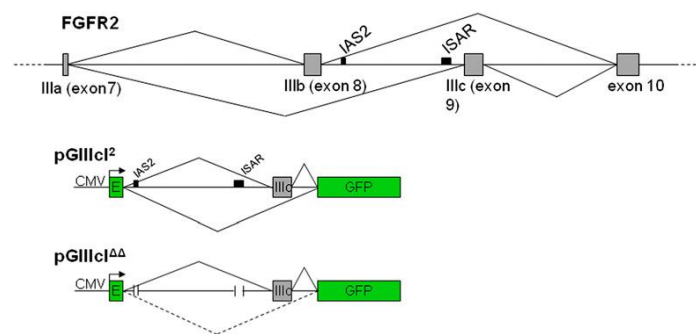


Figura 16: Representação esquemática das construções repórteres de splicing alternativo. Plasmídeo pGIIIc², possui exon IIIc e regiões de sequência de ativação de intron 2 (IAS2) e região de silenciamento e ativação intrônica (ISAR), representados por caixas pretas. A exclusão do exon IIIc leva a expressão da EGFP, enquanto a inclusão IIIc interrompe a estrutura de leitura EGFP, levando a uma baixa ou ausente expressão de EGFP. O plasmídeo, pGIIIc^{ΔΔ}, possui IAS2 e ISAR deletados. Fonte: Somarelli, et al. 2013.

Avaliação de fluorescência das células HepG2 e LLCMK2 estáveis demonstraram alteração no splicing celular do replicon de pEGP-FGFR2. A média de fluorescência de células infectadas com YFV comparadas com não infectadas de pGIIIc² apresentaram diminuição (**Figura 17**). Isto indica que a inclusão do exon IIIc levou a interrupção do quadro de leitura da EGFP diminuindo a fluorescência. Enquanto que

células sem infecção apresentaram exclusão do exon IIIc e, portanto, uma maior fluorescência. Em pGIIIc^{DD}, com IAS2 e ISAR deletados, não foram observadas alterações.

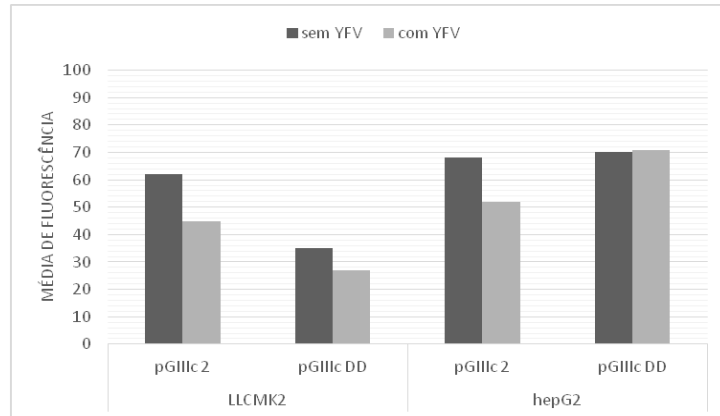
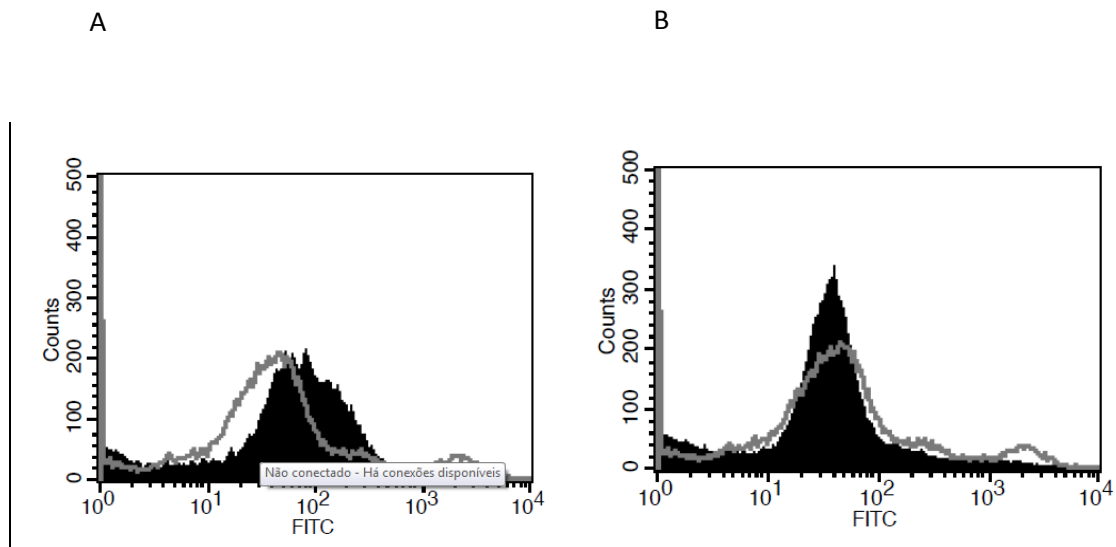


Figura 17: Média de fluorescência estimada por citometria de fluxo. Células HepG2 e LLCMK2 estáveis, na presença e ausência de infecção por YFV.

Na figura 18 (A-C), é possível observar sobreposição de histogramas e significativa redução de fluorescência em replicons pGIIIc² com infecção comparadas com grupo controle sem infecção ($p=0,001$ teste *Kolmogorov-Smirnov*). Análise de replicon com regiões de controle de splicing deletados não apresentaram alterações significativas (**Figura 18 B-D**).



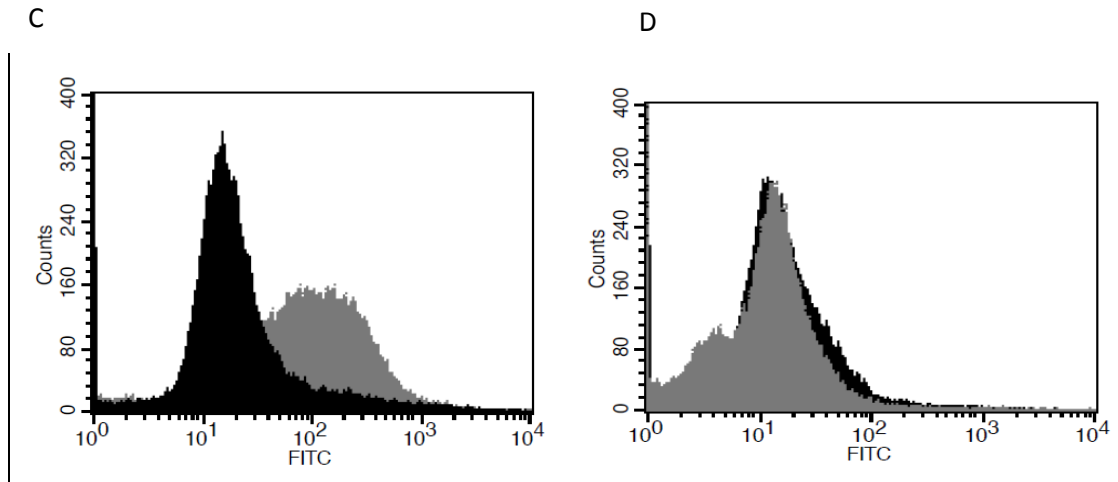
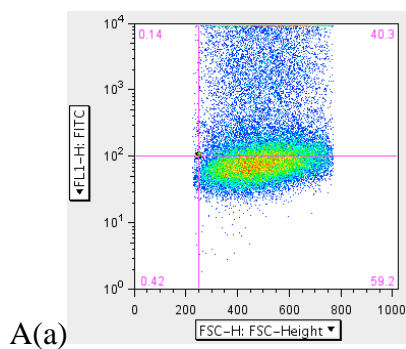


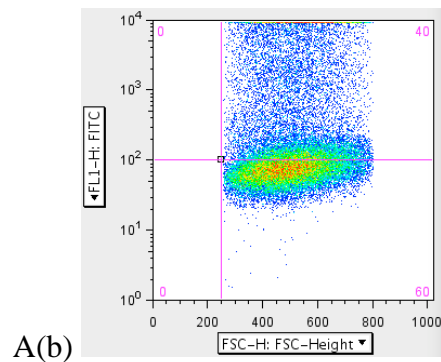
Figura 18: Sobreposição de Histograma. (A, B) Células estáveis LLMCK2. (A), pGIIIc² com regiões de controle, histograma em preto: células sem infecção, linha cinza: com infecção. (B) pGIIIcI^{DD} com regiões de controle deletadas. (C, D) Células estáveis HepG2. (C) pGIIIc^{2c} histograma cinza: células sem infecção, histograma preto: células com infecção. (D) pGIIIcI^{DD} com regiões de controle deletadas. A aquisição de 50.000 células.

Dot plot de aquisições de outro ensaio de células estáveis LLMCK2 estão demonstrados na figura 19, é observado que não ocorrem alteração no grupo controle pEGFP. A (a,b) após a infecção viral. No entanto em B grupo pGIIIc² (a,b) é possível observar a diminuição da frequência de eventos de 39,2 para 17,5 em células infectadas indicando inclusão de exom IIIc.

Sem YFV



Com YFV



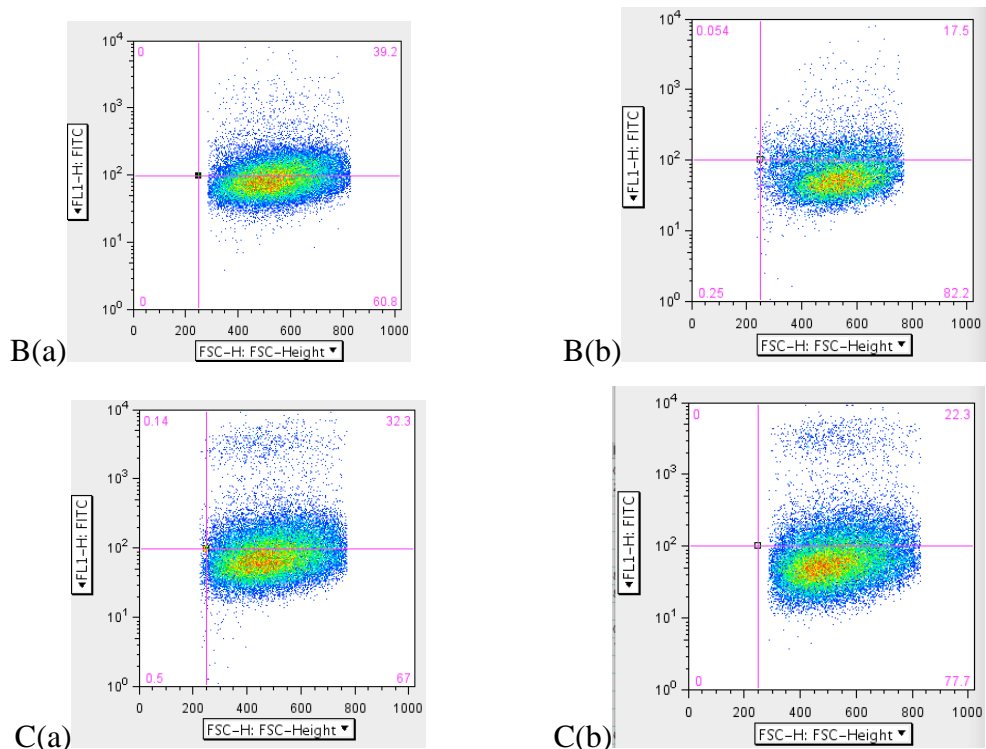


Figura 19: Dot plot de 50.000 eventos células estáveis LLMCK2. (A), controle plasmídeo pGFP. (B), pGIIIc², com regiões controle presentes, (C), pGIIIc^{DD} ISAR e ISS, deletados. Letras minúsculas (a) sem infecção, (b) com infecção.

A caracterização de eventos de splicing tem levado ao desenvolvimento de uma série de construção repórter baseado em fluorescência, que de forma reprodutível, possa mimetizar o padrão de splicing endógeno (OLTEAN et al. 2008, TAKEUCHI et al. 2010)

Portanto, os plasmídeos utilizados neste estudo, permitem avaliar a importância da sequência de ativação de intron 2 (IAS2) e região de silenciamento e ativação intrônica (ISAR) e possíveis alterações ocasionadas por interação de proteínas virais com proteínas envolvidas no recrutamento dessas regiões e no processamento de mRNA.

As isoformas FGFR2 IIIb e IIIc possuem diferença de afinidade de até 1000 vezes pelo seu ligante (DELL e WILLIAMS, 1992).

O splicing alternativo de FGFR2 pode variar de acordo com origem celular. Célula epitelial é esperado que regulem a inclusão do exon IIIb e exclua IIIc, enquanto

que células mesenquimais a regulação apresenta-se de forma oposta (TURNER e GROSE, 2010; SOMARELLI, et al. 2013).

Diversos estudos têm associado à regulação de splicing alterado de FGFR-2–IIIb/IIIC como possíveis marcadores de câncer e síndromes genéticas. A superexpressão de FGFR2-IIIc tem sido associada com processos de carcinogênese. (MAI, et al. 2010; KELLEHER, et al. 2013; PENG, et al. 2014).

No contexto viral foi descrito o papel da proteína de envelope E5 de papiloma vírus tipo 16 alterando a regulação de fator de crescimento de queratinócitos (KGFR/FGFR2b) (PURPURA, et al. 2013). Li et al (2013) mostraram splicing alternativo de FGFR2 associado com infecção viral, cirrose, recorrência e tamanho de tumor. Indicando este como marcador de carcinoma hepatocelular.

Splicing de FGFR2IIIb depende da combinação de efeitos de sítio de splicing fracos com regiões controle, *exonic splicing silencer* (ESS), *intronic splicing silencer* (ISS), *intronic element control* (ICE) e sítio de ligação para proteína *polypyrimidine tract binding* (PTB) (CARTENS, et al. 2000, WAGNER e GARCIA-BLANCO, 2002).

A caracterização de splicing alternativo *in vivo* de FGFR2IIIb em diferentes tecidos: coração, cérebro e olhos o silenciamento do exon IIIb foi dependente de ISSs enquanto que, na pele, o splicing foi independente de ISSs (BONANO et al. 2006).

6.0 CONCLUSÃO

No presente estudo, a interação de hSlu7 foi confirmado em ensaio *ex vivo* com NS5 de YFV em culturas de células de mamífero.

Os resultados sugerem que a superexpressão da proteína hSlu7 influencia na replicação viral.

A transcrição de replicon de ADAR2 apresentou modulação para splicing dependente de hSlu7 na presença de infecção de YF17D, sugestionando que a translocação de hSlu7 para o citoplasma pode influenciar a concentração nuclear e na escolha de sítios de splicing 3'.

Os resultados de splicing alternativos nos replicons de ILR7 e FGFR2, após infecção, podem indicar que a regulação viral atua sobre sítios de splicing fracos e que possíveis interações virais possam alterar direta e indiretamente a regulação *trans-acting*.

A infecção por YFV17D provocou splicing alternativo de XBP-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashour, J., M. Laurent-Rolle, P. Y. Shi, and A. Garcia-Sastre. (2009). NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol*, 83:5408-5418.

Amaral, P.P. and Mattick, J.S. Noncoding RNA in development. *Mamm. Genome*, 19, 454–492.

Ast G. (2004). How did alternative splicing evolve? *Nat Rev* 5: 773–782. Azubel M, Wolf SG, Sperling J, Sperling R. (2004). Three-dimensional structure of the native spliceosome by cryo-electron microscopy. *Mol Cell*; 15: 833–839.

Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 72:291–336.

Bauermann, F.; Julia F. Ridpath, Rudi Weiblen, Eduardo F. Flores (2013). HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25(1) 6–15.

Barret, A. D. T. (2010). Molecular epidemiology of yellow fever virus. *Vaccine, Guilford*, 21(3): 213-220.

Benali-Furet, N.L, Chami, M; L. Houel, F. De Giorgi, F. Vernejoul, D. Lagorce, L. Buscail, R. Bartenschlager, F. Ichas, R. Rizzuto, P. Paterlini-Brechot. (2005). Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene*, 24: 4921–49.

Berg, M.G; Singh, L.N; Younis, I; Liu, Q, Pinto, A.M; Kaida, D; Zhang Z, Cho S, Sherril-Mix, S; Wan L, et al. (2012). U1 snRNP determines mRNA length and regulates isoform expression. *Cell*, 150: 53-64.

Bonano V.I; Oltean S; Brazas R.M; Garcia-Blanco, M.A. (2006). Imaging the alternative silencing of FGFR2 exon IIIb in vivo. *RNA*, 12(12):2073-9.

Bommiasamy, H; Back, S.H; Fagone, P; Lee, K; Meshinchi, S; Vink5, E; Sriburi, R; et al. (2009). ATF6 α induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 122, 1626-1636.

Bronzoni, R. V.M; Madrid, M. C. F. S; Duarte, D. V. B; Pellegrini, V. O. A O. A; Pacca, C. C; Carmo, A. C. V; Zanelli C. F; Valentini, S. R; Santacruz-Pérez, C; Barbosa, J. A. R. G; Lutz, C. S; Rahal, P; Nogueira, M.L. (2011). The small nuclear ribonucleoprotein U1A interacts with NS5 from yellow fever virus. *Arch Virol*

Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E.A., Grard, G., Grimes, J.M., Hilgenfeld, R., Jansson, A.M., Malet, H., Mancini, E.J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., Moureau, G., Neyts, J., Owens, R.J., Ren, J., Selisko, B., Speroni, S., Steuber, H., Stuart, D.I., Unge, T., and Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 87, 125-148.

Burge, C. B., Padgett, R. A. & Sharp, P. A. (1998). Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol. Cell* 2, 773–785.

Burke, D. S., and T. P. Monath. 2001. Flaviviruses, p. 1043-1125. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), **Fields virology**, 4th ed., vol. 1. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia.

Crawley, A.M, Faucher, S, Angel, J.B (2010). Soluble IL-7R α (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection. *J Immunol*, 184: 4679–4687.

Chambers, T.J; Hahn, C. S; Galler R; Rice, C.M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev. Microbiol.*; 44:649-688.

Carninci, P; Yasuda, J; Hayashizaki, Y. (2008). Multifaceted mammalian transcriptome. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20, 274–280

Chen, I. H., L. Li, L. Silva; R. M. Sandri-Goldin. (2005). ICP27 recruits Aly/REF but not TAP/NXF1 to herpes simplex virus type 1 transcription sites although TAP/NXF1 is required for ICP27 export. *J. Virol.* 79:3949–3961.

Costa, et al (2013). Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection Protection versus Disease Induction. *American Journal of Pathology*, 182 (6).

Chua, K; Reed, R. (1999). Spliceosome between the steps of splicing human step II splicing factor hSlu7 functions in restructuring the. *Genes Dev.* 13: 841-850.

Chua, J.J; NG, M.M.L; Chow, V.T. K.(2004). The non-structural 3 (NS3) protein of dengue type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus Res.* Jun 15;102(2):151-63.

Dégallier N; Travassos da Rosa A.P.A; Vasconcelos P.F.C; Travassos da Rosa E.S, Rodrigues, S.G; Sá Filho, G.C; Travassos da Rosa, J.F.S.(1992). New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. *Ciência e Cultura*; 44: 136-42

Deutsch M, Long M. (1999). Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Res* 27: 3219–3228.

Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. et al. (1991). *Flaviviridae*. *Arch.Virol.* Suppl.2, p.223-233.

Fernandez-Garcia, M.D; Mazzon, M; Jacobs, M; Amara, A. (2009). Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe* 5, 318-328.

Figueiredo, R. M. P; Naveca, et al., (2008). Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v.14, n.4, p.667-669.

Figueiredo L.T.M.(2000). The Brazilian flaviviruses. *Microbes and Infections* 2: 1643-1649.

Fontoura, B. M., Faria, P. A; Nussenzveig, D. R. (2005). Viral interactions with the nuclear transport machinery. Discovering and disrupting pathways. *IUBMB Life* 57, 65–72.

Fontaine-Rodriguez, E. C; Knipe, D. M. (2008). Herpes simplex vírus ICP27 increases translation of a subset of viral late mRNAs. *J. Virol.* 82, 3538–3545.

Gardner, C. L; and Ryman, K. D. (2010) Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med.* 30: 237-260.

Gaviolli, A.F.G. (2011). Interação entre a proteína celular hSlu7 e a proteína NS5 do vírus da Febre Amarela. Dissertação tese Mestrado (Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP.

Gandy, S.Z; et al 2007. RNA editing of the human herpesvirus 8 kaposin transcript eliminates its transforming activity and is induced during lytic replication. *J. Virol.* 81:3544-13551.

George, C.X, Gan, Z, Liu, Y, Samuel, C.E. (2011). Adenosine deaminases acting on RNA, RNA editing, and interferon action. *J Interferon Cytokine Res*; 31(1):99-117.

Green, A.M, Beatty, P.R, Hadjilaou, A, Harris, E. (2014). Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol.* 20;426(6):1148-60.

Goodwin, R.G, Friend D, Ziegler, S.F, Jerzy ,R; Falk, B.A, Gimpel S, Cosman D, Dower SK, March CJ, Namen AE, et al. (1990). Cloning of the human and murine interleukin-

7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 60: 941–951.

Hall, S. L. & Padgett, R. A. (1994). Conserved sequences in a class of rare eukaryotic nuclear introns with non-consensus Splice sites. *J. Mol. Biol.* 239, 357–365.

Hadler JL, Patel D, Bradley K, Hughes JM, Blackmore C, Etkind P, Kan L, Getchell J, Blumenstock J, Engel J. (2014). National capacity for surveillance, prevention, and control of west nile virus and other arbovirus infections - United States, 2004 and 2012.;MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Apr 4;63(13):281-4.

Iizasa, H, et al. (2010). Editing of Epstein-barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency. *J.B. Chem.* 285: 33358-33370.

Kaida, D; Berg, M.G; Yonis, I; Kasim, M; Singh, L.M; Wan, L; Dreyfuss, G.(2010). U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature* 468:664-669.

Khadka S, Vangeloff AD, Zhang C, Siddavatam P, Heaton NS, et al. (2011) Aphysical interaction network of dengue virus and human proteins. *Mol Cell Proteomics* 10: M111 012187.

Kaser A, et al. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*, 134:743–756.

Kawahara, Y; Ito, K; Ito, M; Tsuji, S; Kwak, S.(2005). Novel splice variants of human ADAR2 mRNA: skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites. *Gene*, 19;363:193-201.

Krawczak, M. et al. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNAsplice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum. Genet.* 90, 41–54.

Keating, K. S., Toor, N., Perlman, P. S., Pyle, A. M. (2010). A structural analysis of the group II intron active site and implications for the spliceosome. *RNA*, 16, 1–9.

Knipe, D; Howley, P.M; Griffin, D.E; Lamb, R.A; Martin, M.A; Roizman B; Straus S.E. **Fields Virology**.5. Lippincott Williams and Wilkins; Philadelphia: 2007.

Krishnan MN, Ng A, Sukumaran B, Gilfoy FD, Uchil PD, et al. (2008) RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* 455: 242–245.

Konarska, M. M., Vilardell, J., Query, C. C. (2006). Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Mol. Cell*, 21, 543–553.

Larralde, O; Smith, R.W. P; Wilkie, G. S; P; Malik, P; Gray, N.K; Clements, J.B.(2006). Direct Stimulation of Translation by the Multifunctional Herpesvirus ICP27 Protein. *J. Virol*, 80(3):1588.

Le Breton M, Meyniel-Schicklin L, Deloire A, Coutard B, Canard B, et al. (2011) Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC Microbiol* 11: 234.

Lee, A.H, Scapa, E.F, Cohen, D.E, Glimcher, L.H (2008). Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*, 320:1492–1496.

Lindenbach, B. D., and C. M. Rice. 2001. Flaviviridae: The viruses and their replication, p. 991-1041. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 1. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

Lindenbach B. D, Thiel H-V, Rice C.M. (2007). Flaviviridae: the viruses and their replication. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven. pp. 1101–1152.

Li, Z; Wolff, K.C; Samuel, C.E.(2010). RNA adenosine deaminase ADAR1 deficiency leads to increased action of protein kinase PKR and reduced vesicular stomatitis virus growth following interferon treatment. *Virology*. 396: 316-322.

Liu G.Z, Fang L.B, Hjelmstrom P, Gao X.G. (2007). Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*; 13:149-55.

Liu, ZI-HUI; Wang, Ming-Hui; Ren, Hong-Jiu; et al. (2014). Interleukin 7 signaling prevents apoptosis by regulating bcl-2 and bax via p53 pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Int J. Exp. Pathol*, 7(3): 870-881.

Lunemann JD, Munz C. (2007). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*; 7:253-8.

Mairiang D, Zhang H, Sodja A, Murali T, Suriyaphol P, et al. (2013). Identification of New Protein Interactions between Dengue Fever Virus and Its Hosts, Human and Mosquito. *PLoS ONE* 8(1): e53535.

Madrid, M.C.F.S. (2007). Identificação de Interação Proteína-Proteína entre NS5 do vírus da Febre Amarela e Proteínas Celulares. Dissertação Mestrado (Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP.

Martinez, I; Melero, J.A. (2002). A model for the generation of multiple A to G transitions in the human respiratory syncytial virus genome: predicted RNA secondary structures as substrates for adenosine deaminases that act on RNA. *J. Gen. Virol.* 83:1445-1455.

Mattick, J.S. (1994). Introns: evolution and function. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4, 823–831.

Malik, P; Tabarraei, A; Kehlenbach, R.H; Korfali, N; Iwasawa, R; Graham, S.V; Schirmer, E.C. (2012). Herpes Simplex Virus ICP27 Protein Directly Interacts with the Nuclear Pore Complex through Nup62, Inhibiting Host nucleocytoplasmic Transport Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*; 287,(15): 12277–12292.

Melandri V, Guimarães AE, Komar N, Nogueira ML, Mondini A, Fernandez-Sesma A, Alencar J, Bosch I (2012). Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*;107: 1073-1075.

McGrail, J. C., Krause, A., O’Keefe, R. T. (2009). The RNA binding protein Cwc2 interacts directly with the U6 snRNA to link the nineteen complex to the spliceosome during pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*, 37,4205–4217.

Monath, T. P. (2001). Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis*;1 (1): 11-20.

Morrison, J. Sebastian Aguirre and Ana Fernandez-Sesma (2102). Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. *Viruses*, 4, 397-413.

Morais A.T, Terzian, A.C, Duarte D.V, Bronzoni R.V, Madrid M.C, Gavioli A.F, Gil L.H, Oliveira A.G, Zanelli C.F, Valentini S.R, Rahal P, Nogueira M.L. (2013). *Virol J.* 22;10:205.

Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers (ed.). (1995). Virus taxonomy: classification and nomenclature of virus. *Spring-Verlag*, New York, N.Y. p. 415–421

Munoz-Jordan J.L, Sánchez-Burgos G.G, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Natl Acad Sci USA*;100:14333–8.

McKay F.C, Swain LI, Schibeci S.D, Rubio J.P, Kilpatrick T.J, Heard R.N, et al. (2008). Haplotypes of the interleukin7 receptor alpha gene are correlated with altered expression in whole blood cells in multiple sclerosis. *Genes Immun*; 9:1-6.

Mueller S.N, Ahmed R. (2009). High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA*; 106:8623-8.

Nilsen, T. W. (2003). The spliceosome: The most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays*; 25: 1147–1149.

Nilsen T. W, Graveley B. R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*; 463: 457–463.

Oltean S, Febbo PG, Garcia-Blanco MA. (2008). Dunning rat prostate adenocarcinomas and alternative splicing reporters: Powerful tools to study epithelial plasticity in prostate tumors in vivo. *Clin Exp Metastasis*; 25: 611–619.

Pauvolid-Corrêa, A; Morales, M.A; Levis, S; Figueiredo, L.T.M; Couto-Lima, D; Campos, Z; Nogueira, M.F; Silva, E.E; Nogueira, R.M.R; Schatzmayr, H.G.(2011). Neutralising antibodies for West Nile Virus in horses from Brazilian Pantanal. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*,.06 (4): 474-476.

Patel A. A, Steitz J. A. (2003). Splicing double: Insights from the second spliceosome *Nat Rev Mol Cell Biol*; 4: 960–970.

Park, N., Skern, T., and Gustin, K. E. (2010). Specific cleavage of the nuclear pore complex protein Nup62 by a viral protease. *J. Biol. Chem.* 285, 28796–28805.

Petersen, J. M., Her, L. S., and Dahlberg, J. E. (2001). Multiple vesiculoviral matrix proteins inhibit both nuclear export and import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8590–8595.

Peng, W.X; Kudo M, Fujii, T; Teduka K, Naito Z.(2014). Altered expression of fibroblast growth factor receptor 2 isoform IIIc: relevance to endometrioid adenocarcinoma carcinogenesis and histological differentiation. *Int J Clin Exp Pathol*, 15;7(3):1069-76

Purcell, D.F; Martin, M.A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol.*;67:6365–6378.

Purpura, V; Belleudi, F; Caputo, S, Torrisi M.R. (2013). HPV16 E5 and KGFR/FGFR2b interplay in differentiating epithelial cells. *Oncotarget*. 4(2):192-205.

Rose, T; Lambotte O; Pallier, C; Delfraissy J.F; Colle J.H. (2009). Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1-infected patients. *J Immunol*, 182: 7389–7397.

Rice, C. M., E. M. Lenches, S. R. Eddy, S. J. Shin, R. L. Sheets, and J. H. Strauss. (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*; 229:726-733.

Rueter SM, Dawson RT, Emeson RB. (1999). Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature*; 399:75–80.

Sandri-Goldin, R. M. (2008) The many roles of the regulatory protein ICP27 during herpes simplex virus infection. *Front. Biosci.* 13, 5241–5256.

Sammicheli S, Dang VP, Ruffin N, Pham HT, Lantto R, Vivar N, Chiodi F, Rethi B. IL-7. (2011). Promotes CD95-Induced Apoptosis in B Cells via the IFN- γ /STAT1 Pathway. *PLoS One* ; 12: 28629.

Samuel, C.E. (2011). Adenosine deaminase acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral. *Virology*; 411:180-193.

Smith, R. W; Malik, P., Clements, J. B. (2005). The herpes simplex virus ICP27 protein. A multifunctional post-transcriptional regulator of gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 499–501.

Scaramozzino N, Crance J. M, Jouan A, De briel D.A, Stoll F, Garin D. (2001). Comparison of Flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol* 39: 1922-1927.

Schwartz S; Felber B. K; Benko D. M; Fenyo E-M; Pavlakis G. N.(1990). Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.*;64:2519–2529.

SILVA, Jaqueline Raymondi et al . (2013). Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*.

Strode GK (ed.). (1951). Yellow fever. *New York: McGraw-Hill*.

Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. (2011). The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J.Gen. Virol.* 92:233–246.

Shomron, N., Alberstein, M., Reznik, M. and Ast, G. (2005). Stress alters the subcellular distribution of hSlu7 and thus modulates alternative splicing. *J. Cell Sci.* 118, 1151-1159.

Su, H. L., C. L. Liao, and Y. L. Lin. (2002). Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J. Virol.* 76:4162-417.

Tanaka, N., Aronova, A., Schwer, B. (2007). Ntr1 activates the prp43 helicase to trigger release of lariat-intron from the spliceosome. *Genes Dev*, 21, 2312–23.

Takeuchi A, Hosokawa M, Nojima T, Hagiwara M. 2010. Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching mechanism of tissue-specific alternative exon selection. *PLoS ONE* 5: e10946. doi: 10.1371/journal.pone.0010946.

Tappe, D; Rissland, J; Gabriel M; Emmerich, P; Günther, S; Held, S, Smola, S; Schmidt-Chanasit, J.(2014). First case of laboratory- confirmed Zika virus infection imported into Europe, novembro 2013. *Eurosurveillance*, Volume 19, Issue 4, 30.

Thiel H-J, Collett MS, Gould EA, et al. (2005). Flaviviridae. In: *Virus taxonomy—eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, ed. Fauquet CM, Mayo MA, Manilo-off J, pp. 981–998. *Elsevier Academic Press*, San Diego, CA.

Tian B, Pan Z, Lee JY (2007). Widespread mRNA polyadenylation events in introns indicate dynamic interplay between polyadenylation and splicing. *Genome Res* 17: 156–165.

Valadkhan, S., Role. (2010). Role of the snRNAs in spliceosomal active site. *RNA Biol.*

Valadkhan, S; Jaladat, Y. (2010). The spliceosomal proteome: At the heart of the largest cellular ribonucleoprotein machine. *Proteomics*, 10, 4128–4141.

Vasconcelos P. F. C. (2003). Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36(2):275-293.

Vasconcelos P. F. C. (2002). Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. *Rev Bras Epidemiol*, 5(3):244-258.

van der Schaar, H. M. *et al.* (2008). Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathogens*.

Verma, D; Bais, S; Gaillard, M; Swaminathan, S. (2010). Epstein-Barr Virus SM Protein Utilizes Cellular Splicing Factor SRp20 To Mediate Alternative Splicing. *Journal of Virology*; 84: 22, - 11781–11789.

Will C.L; Luhrmann R. (2006). Spliceosome structure and function. In *The RNA world*, 3rd ed. (ed. R.F. Gesteland et al.),. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*. pp. 369–400.

WHO. Yellow fever factsheet.[online], <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>> acesso em 2014.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107:881–89.

Zamore, P.D; Haley ,B. (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*, 309, 1519–1524.

Zeng, L; Zampetaki, A; Margaritis, A; et al. (2009). Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *PNAS*, 106(20): 8326 – 833.

Zheng, Z-M. (2004). Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. *J Biomed Sci*; 11(3):278–294.