

## **CAPÍTULO II**

**(Produção de anticorpos inibidores da replicação viral)**

**Revista: mAbs (Landes Bioscience):**

**Título: Produção de anticorpos inibidores da replicação viral**

**Abreviaturas:**

ADE, aumento dependente de anticorpo; ATCC, American Type Culture Collection; bp, pares de bases; KDa, quilodalton, BSA, Albumina do Soro Bovino; C, capsídeo; DENV, vírus da dengue; DF, Febre da dengue; DHF, Febre da Dengue Hemorrágica; DSS, Síndrome do Choque da Dengue; E, Envelope; ELISA, Ensaio imuno-enzimático; SFB, Soro Fetal Bovino; HRP, marcação de com peroxidase; scFv, fragmento variável da cadeia simples; Ig, Imunoglobulina; IPTG, isopropyl- $\beta$ -D1-thiogalactopyranoside; LB, Luria-Bertani; M, Membrana; MEM, Meio essencial mínimo; NEAA, aminoácidos não essenciais; NS1, proteína não estrutural 1; OD, densidade optica; PBS, Tampão fosfato salino ; PBST, PBS com 0.05% (v/v) Tween-20; PCR, Reação da cadeia de polimerase; qPCR, PCR quantitativa, PEG, polyethyleneglycol; TMB, 3, 3', 5, 5, -tetramethylbenzidine; TPB, tryptose phosphate broth; VH , cadeia pesada da região variável; VL , cadeia leve da região variável, TA-Temperatura ambiente, FITC - fluorescein isothiocyanate, TRITC- Tetramethylrhodamine, RE-retículo endoplasmático.

**Resumo:**

Dengue é uma doença arboviral de grande importância para a saúde pública. O seu principal vetor de transmissão é o mosquito *Aedes aegypti*, que se desenvolve em áreas tropicais e subtropicais. Apesar de não parecer agressiva, a dengue pode originar o aparecimento de hemorragia, evoluindo para um quadro de febre hemorrágica ou síndrome do choque hemorrágica. Os principais sintomas da doença hemorrágica é o aparecimento de sangramentos e queda de pressão arterial que pode levar à morte quando mal tratada. Devido à sua gravidade, a melhor maneira de se evitar a infecção é tomando atitudes preventivas e impedindo a reprodução do mosquito. A fim de se combater a

disseminação da doença, muitas vacinas têm sido desenvolvidas nas últimas décadas baseada em vírus inativados, vírus atenuados químéricos, proteínas recombinantes e vacinas de DNA, contudo, ainda não há uma terapia antiviral eficiente para combater o vírus da dengue. Assim, neste trabalho, selecionaram-se fragmentos de anticorpos por *Phage Display* capazes de reconhecerem a proteína do envelope viral e NS1 do vírus da dengue. A região codificante o anticorpo advindo do pComb3X foi subclonado em um vetor de expressão em células de mamífero. Os clones celulares transfectados mostram-se capazes de diminuir em mais de 90% o título de replicação do vírus da dengue sorotipo 1 após 1 e 3 dias de infecção., e pelo menos 78% do título do vírus no sorotipo 2 após um dia de infecção.

**Palavras chaves:** Dengue, NS1, scFv, *Phage Display*, inibição da replicação, terapia antiviral.

## Introdução

Dengue é uma doença arboviral infecciosa de rápida dispersão através da picada do mosquito *Aedes. sp*, sendo considerada um problema de saúde pública pela comunidade internacional<sup>1</sup>. Existem 4 sorotipos do vírus da dengue atualmente descritos, entretanto, recentemente foi descoberto um novo sorotipo viral circulante em macacos na Ásia, que foi denominado de dengue sorotipo 5<sup>2</sup>. Clinicamente a dengue é dividida em 3 subtipos: Dengue clássica (Febre da Dengue–DF), a qual é caracterizada por uma forma mais leve da doença, semelhante a uma gripe; a Dengue Hemorrágica (DHF), caracterizada por uma gravidade maior da doença apresentando alterações na coagulação sanguínea da

pessoa infectada; e a Síndrome do Choque da Dengue (DSS), a qual é evolui a partir da DHF e apresenta a manifestação mais grave da dengue, caracterizando-se por uma grande queda ou ausência de pressão arterial<sup>3, 4</sup>.

Dentre os fatores que predispõem o desenvolvimento da DHF ou DSS está o aumento da replicação viral causada pela infecção por outro sorotipo do vírus da dengue. Durante a infecção secundária, os anticorpos não-neutralizantes gerados pela infecção primária auxiliam na internalização do vírus, desenvolvendo a imuno-amplificação viral dependente de anticorpo (ADE)<sup>5</sup>.

Após a infecção, a fita de RNA positiva do vírus da dengue codifica 3 proteínas estruturais (C, E, prM) e 7 não estruturais (NS1; NS2A; NS2B; NS3; NS4A; NS4B e NS5), as quais são importantes para infecção, montagem, replicação e tradução viral<sup>6</sup>. Entre as proteínas expressas, a glicoproteína E é constituída por três domínios: DI, DII, DIII. Ela representa a maior proteína que contém determinantes antigênicos expostos na superfície do vírus, essencial para a interação e entrada do vírus na célula<sup>7, 8</sup>. O EDIII é um peptídeo contínuo estendido do DI que possui conformação semelhante ao domínio imunoglobulínico (Ig), sendo considerada uma região importante para a interação com os receptores. Enquanto que os EDI e EDII são sequências descontínuas e conectadas por quatro peptídeos *linkers* que formam o anel EDI/EDII<sup>9, 10</sup>.

A proteína NS1 é uma proteína conservada e glicosilada de 48KDa que possui seis pontes dissulfeto intramoleculares. Ela é sintetizada como um monômero e sofre modificações pós traducionais, como a adição de resíduos de manose no lúmen do retículo, para o processo de dimerização. Após o processamento, a molécula de NS1 pode se localizar no interior e na superfície da célula ou ser secretada no espaço extracelular<sup>11</sup>. Embora ainda não se saiba especificamente a

sua função, a forma homodimérica da NS1, presente no interior da célula, é encontrada associada ao complexo de replicação viral no interior de vesículas lipídicas na região perinuclear<sup>12</sup>.

Diversas aplicações biotecnológicas têm sido desenvolvidas para combater a replicação do vírus da dengue, contudo, não há nenhuma medida terapêutica eficaz contra a infecção viral, o que reforça a necessidade de estudos aplicados para desenvolvimento de terapias antivirais<sup>13</sup>. As aplicações terapêuticas mais desenvolvidas para combate da doença, atualmente, estão são as vacinas de segunda geração. A vacinação com proteínas recombinantes ou vírus atenuados químéricos têm mostrado um efeito protetor para alguns vírus como o da febre amarela (YFV)<sup>14</sup>, vírus do Nilo Ocidental (WNV)<sup>15, 16</sup>, vírus da encefalite japonesa (JEV)<sup>17</sup>, assim como para o vírus da dengue<sup>18-20</sup>. Além disso, a produção de vacinas de DNA que codificam proteínas virais também têm sido desenvolvido, uma vez que podem induzir a resposta humoral e celular de longa duração<sup>21</sup>.

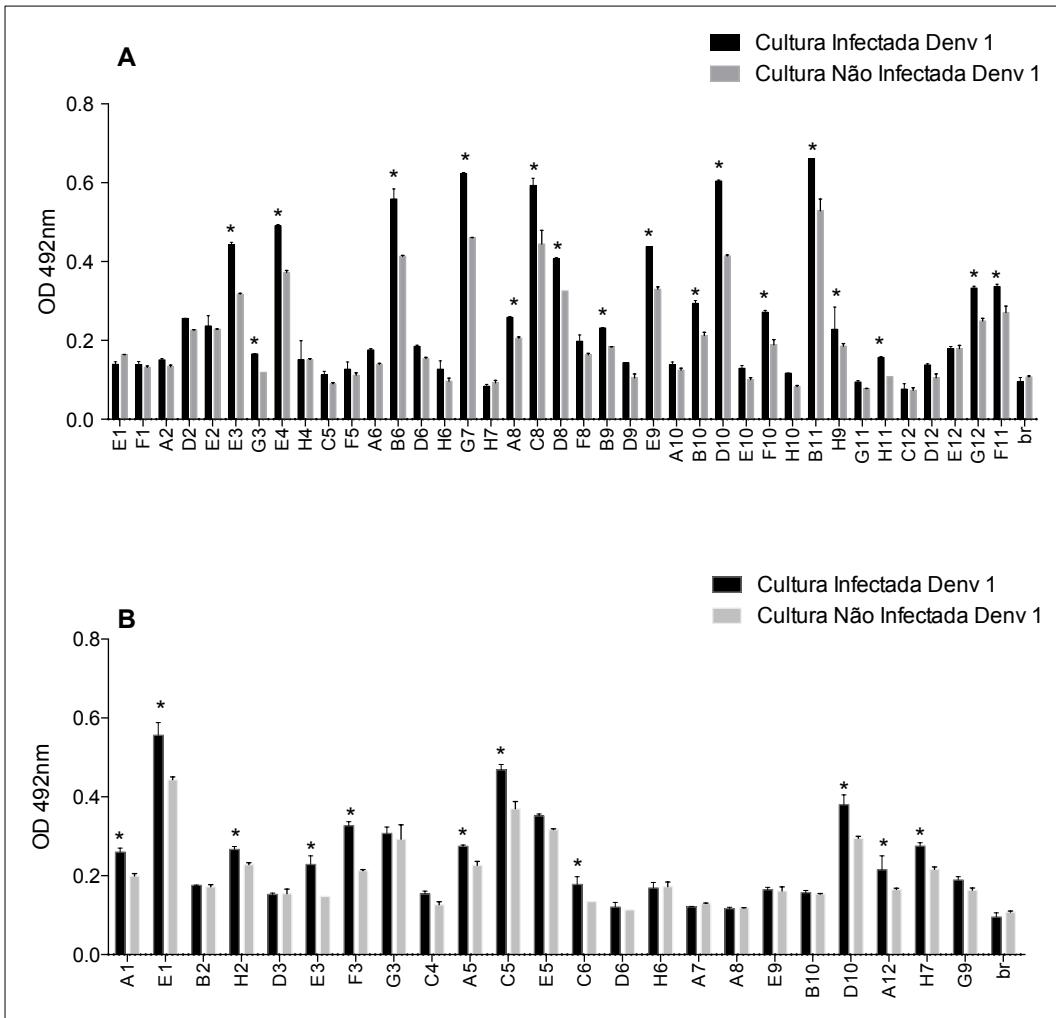
A fim de desenvolver uma nova estratégia antiviral mais eficiente, neste trabalho, foram produzidos anticorpos recombinantes expressos em célula Vero capazes de inibir a replicação viral através do bloqueio da molécula de NS1 e da proteína E.

## Resultados

### **Seleção de anticorpos recombinantes contra a proteína do envelope do vírus da dengue e contra a proteína NS1 por Phage Display**

Após o terceiro ciclo de seleção do *biopanning* de scFv, o pool de fagomídeos foi extraído e utilizados para transformação de bactérias Top10F com intuito de produzir fragmentos de anticorpos solúveis. Os clones de scFv ligantes ao vírus

(Fig. 1A) e NS1 (Fig. 1B), foram selecionados randomicamente e identificados pelo teste ELISA.

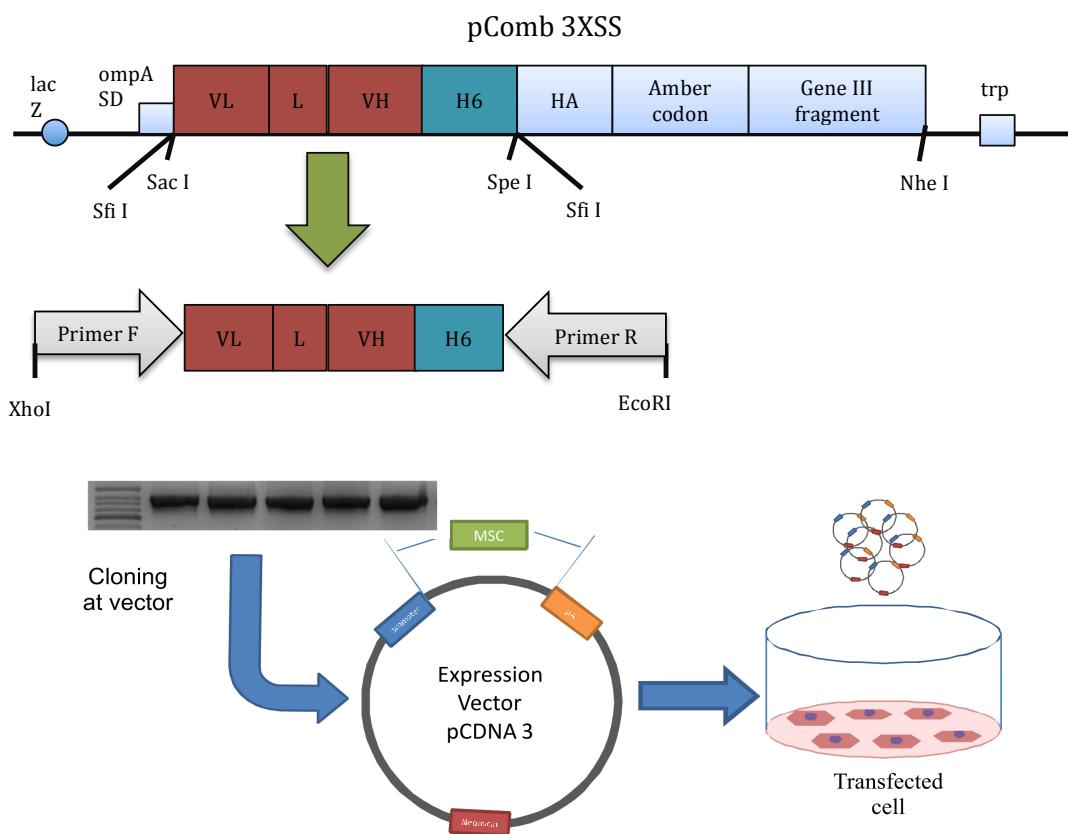
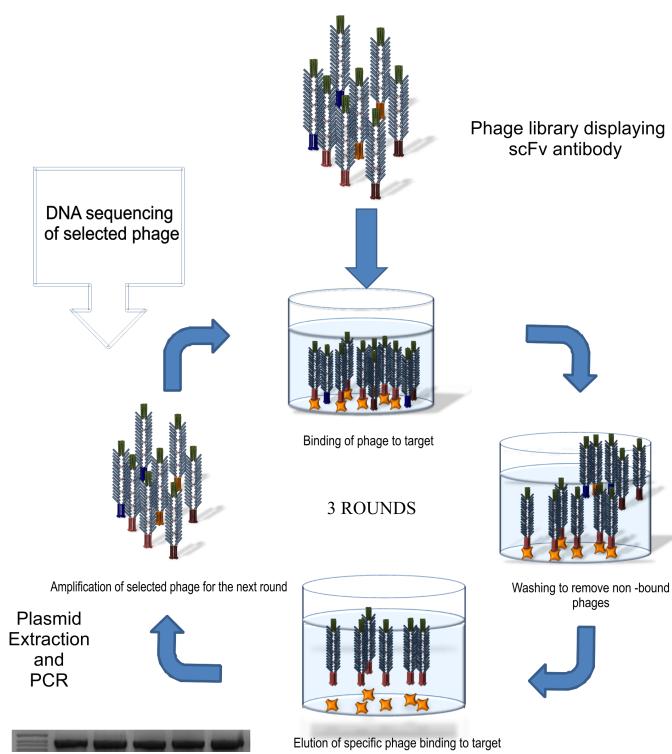


**Figura 1 – Resultado de ELISA obtidos através de seleção de anticorpos recombinantes por Phage Display.** As letras alfabéticas representam a reatividade dos clones de bactérias que expressam anticorpos recombinantes contra a proteína do envelope viral (A) e contra NS1 (B). Os poços foram sensibilizados tanto com a cultura infectada pelo vírus da dengue, quanto para a cultura não infectada e a interação do scFv solúvel expresso pela TOP10F foi detectada com anticorpo anti-HA marcado com peroxidase. O símbolo \* representa os clones que apresentaram diferença significativa ( $p < 0.001$ ) no Múltiplo teste t não pareado, com o pós teste Holm- Sidak. Estatística realizado pelo programa GraphPad Prism 6.0. A barra superior mostra a media e desvio padrão da OD492nm de triplicata de amostra independente.

Dos 39 clones expressos em TOP10F selecionados contra o envelope da partícula viral que expressaram o tag-HA, somente 18 clones apresentaram reatividade significativa ( $p<0.001$ ) contra as proteínas virais presente na cultura infectada com o vírus da dengue (Fig. 1A). Já para a seleção contra a molécula de NS1, dos 23 clones, 11 apresentaram reatividade significativa ( $p<0.001$ ) (Fig. 1B).

#### **Subclonagem dos clones de scFv selecionados em vetor de expressão (pcDNA3) em células de mamífero**

Os clones que apresentaram a maior reatividade e razão, entre as ODs de cultura infectada com vírus/cultura não infectada (Figura 1), foram escolhidos para serem expressos em célula Vero. Os clones scFv-D10<sub>V</sub>, scFv-G7<sub>V</sub>, scFv-E3<sub>V</sub> selecionados contra a partícula viral, e os clones scFv-F3<sub>NS1</sub> e scFv-E1<sub>NS1</sub> selecionados contra a molécula NS1 do vírus Dengue 1, foram sequenciados e subclonados no vetor pcDNA3 para transfectar as células Vero (Fig. 2).



**Figura 2 - Esquema do Biopannig, subclonagem e transfecção do vetor pCDNA 3 para a expressão de scFv solúvel em células Vero.**

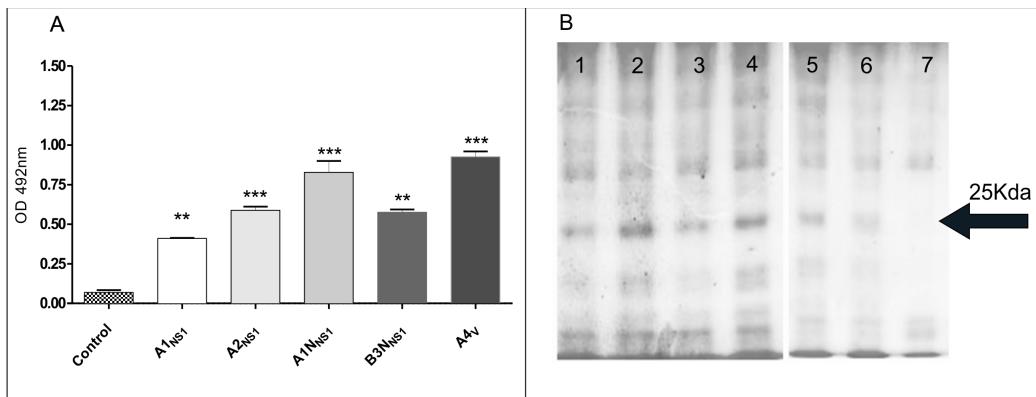
A figura 2 representa o esquema da seleção de fragmentos de anticorpos recombinantes e subclonagem da molécula de scFv no vetor de expressão pCDNA 3. Neste vetor foi inserido um peptídeo sinal derivado da sequência líder derivado da cadeia pesada da molécula de IgG *in frame* com a sequência codificante de scFv com intuito de direcionar a tradução para o interior do retículo endoplasmático da célula.

### **Análise da expressão de scFv solúvel dos clones celulares**

Após a transfecção estável e seleção com geneticina, somente os clones celulares, contendo os insertos que codificam os anticorpos recombinantes F3<sub>NS1</sub> e E3<sub>V</sub>, selecionados contra a proteína NS1 (scFv-F3<sub>NS1</sub>) e contra a proteína do envelope(scFv-E3<sub>V</sub>), respectivamente, foram obtidos. Para os insertos de scFv-F3<sub>NS1</sub> sobreviveram 4 clones celulares nomeados como A1<sub>NS1</sub>, A2<sub>NS1</sub>, A1N<sub>NS1</sub>, B3N<sub>NS1</sub> e enquanto que para o scFv-E3<sub>V</sub>, isolou-se somente um clone celular denominado A4<sub>V</sub>.

A produção de anticorpo pelas células foi analisada por ELISA e SDS-PAGE. Pelo teste de ELISA verificou-se uma reatividade significativa (teste de Turkey,  $p<0.001$ ) dos sobrenadantes da cultura celular transfetada para a produção de anticorpos solúveis quando comparado ao sobrenadante da cultura controle (células não transfetadas) (Fig. 3A). A reatividade com as células transfetadas mostra que as células foram capazes de produzir moléculas de scFv solúveis, sendo que os clones A1N<sub>NS1</sub> e A4<sub>V</sub> apresentaram maiores reatividades. A expressão da proteína scFv pela células pode ser confirmada por SDS-PAGE. Ao submeter o sobrenadante da cultura celular transfetada a eletroforese pode verificar pelo gel corado a presença de uma banda de aproximadamente de 25

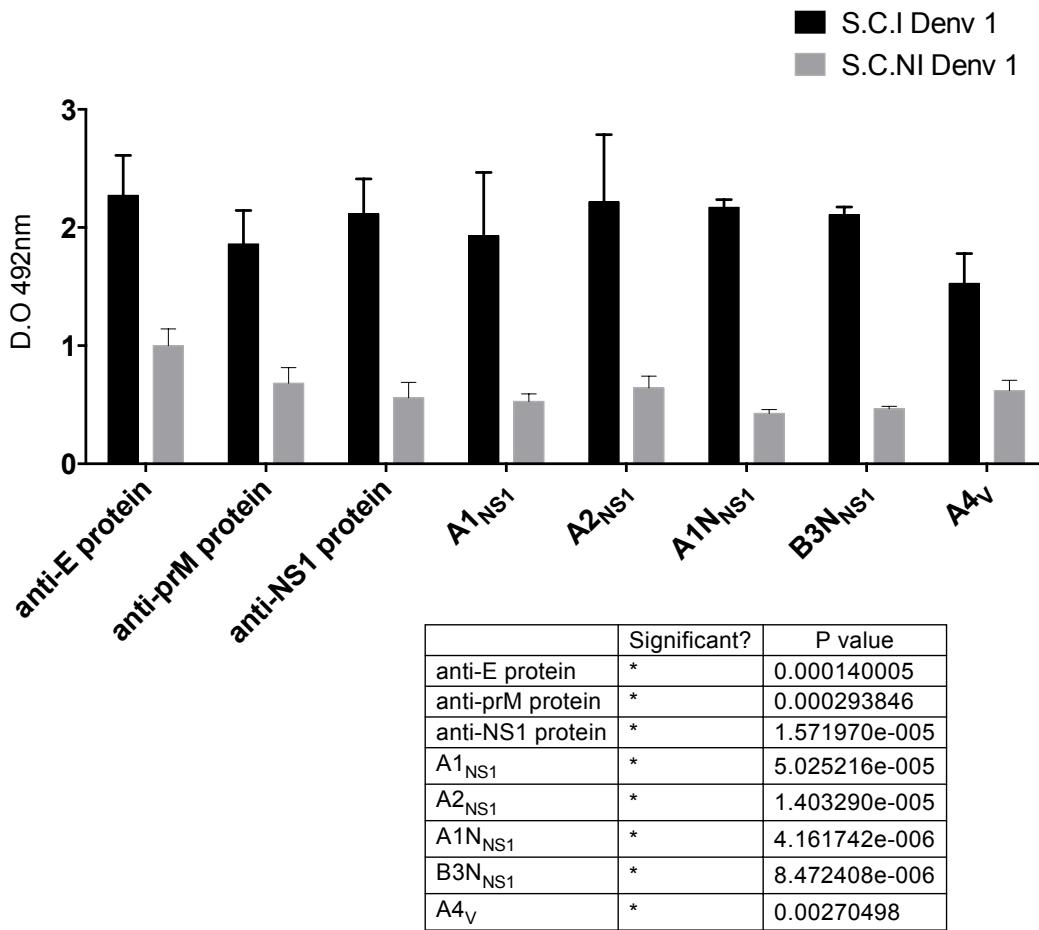
KDa quando comparada a ausência da banda na cultura controle, sugerindo, assim, que as células selecionadas estão produzindo a moléculas de anticorpos.



**Figura 3- Ensaio de ELISA e SDS PAGE para a detecção da expressão de scFv em cultura de célula.** (A) – Gráfico de reatividade do scFv em cultura. O imunoensaio foi feita por meio da sensibilização, em triplicata, de uma placa de microtitulação carregada com o sobrenadante da cultura transfetada com e célula controle. Os símbolos \* indicam a reatividade significativa ( $P<0.05$ ) da expressão do anticorpo recombinante quando comparada com a célula controle. A quantidade \* refere-se o nível de significância de cada clone. A estatística realizada foi Anova one-way com Turkey como pós teste. (B) – Gel SDS-PAGE para analisar a expressão do scFv presente no sobrenadante das culturas selecionadas e célula controle. A figura mostra a presença de uma banda de proteína diferencialmente expressa de 25KDa presente nas culturas selecionadas e ausente na célula controle. Os números representam: 1- clone A1<sub>NS1</sub>, 2- A2<sub>NS1</sub>, 3- A1N<sub>NS1</sub>, 4- B3N<sub>NS1</sub>, 5-A4<sub>V</sub>, 6- Controle Positivo (clone previamente testado para a verificação de expressão do anticorpo) e 7- Controle Negativo.

#### Reatividade do scFv produzido na cultura de célula contra o vírus ou NS1

Foi verificada através do ensaio imuno-enzimático a ligação dos scFv solúveis produzidos pela cultura de células Vero contra as proteínas virais (NS1 e E). Os scFvs (A1<sub>NS1</sub>, A2<sub>NS1</sub>, A1N<sub>NS1</sub>, B3N<sub>NS1</sub>, A4<sub>V</sub>) produzidos pela cultura celular conseguiram diferenciar significativamente ( $p<0.05$ ) a cultura infectada da não infectada de forma semelhante aos anticorpos comerciais, anti- proteína E, anti- proteína NS1 e anti- proteína prM, utilizados como controles positivos (Fig. 4).



**Figura 4- Avaliação da reatividade dos scFvs contra as proteínas virais pelo ensaio de ELISA.** O gráfico representa a média da triplicata da densidade óptica da cultura infectada (C.I DENV) e da não infectada (C.NI DENV). O imunoensaio foi feita por meio da sensibilização de uma placa de microtitulação carregada com o sobrenadante da cultura infectada (S.C.I DENV1) e com sobrenadante da cultura não infectada (S.C.NI DENV1). Os anticorpos comerciais anti-E, anti-prM, e anti-NS1 foram utilizados como controle positivo da reação. Os clones de scFvs foram testados em triplicada e a barra superior representa a média e o desvio padrão. Os dados de cada OD, tanto da cultura infectada como da não infectada, foram normalizados dividindo-os pela média da cultura não infectada. A tabela representa a significância tanto dos controles positivos e como dos clones testados. A análise estatística foi múltiplo teste-t com pós teste com o pós teste Holm-Sidak.

#### Análises *In silico*

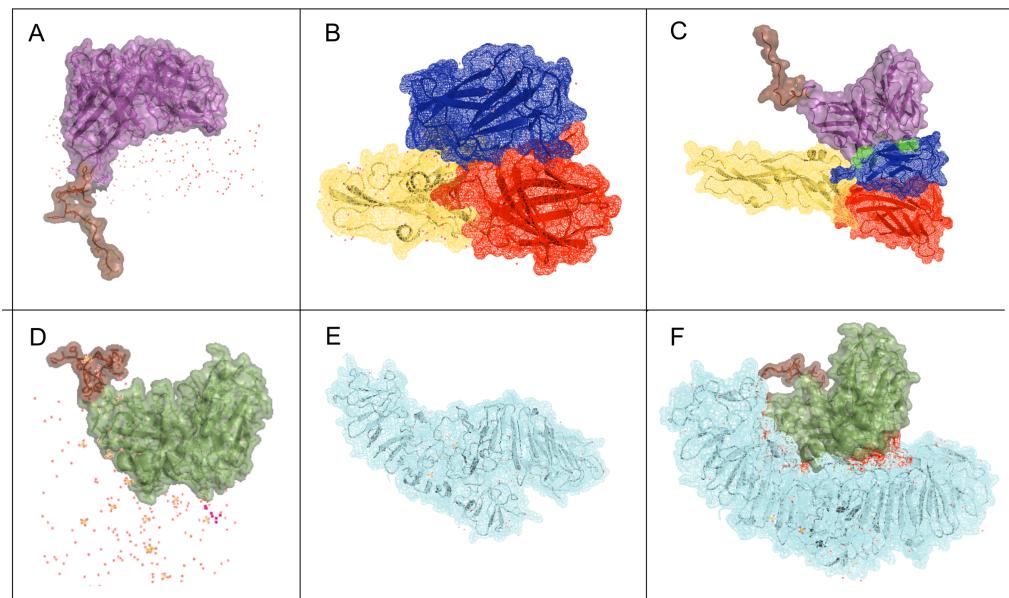
Com intuito de verificar a formação do complexo anticorpo-antígeno, foi feita uma predição estrutural da molécula de anticorpo através do programa *online* *RaptorX* e posteriormente um *docking* entre clone scFv-E3<sub>V</sub> e scFv-F3<sub>NS1</sub> e as

proteínas do Envelope viral e NS1, respectivamente, com o programa *Pathdock**ing*.

Para o modelamento dos fragmentos de anticorpos, ambos os clones apresentaram valores de p altamente significativos de 1.38e-15 para o clone scFv-E3<sub>V</sub> e 2.08e-18 para o clone scFv-F3<sub>NS1</sub>, mostrando a eficiência da modelagem do anticorpo.

O *docking* entre o anticorpo modelados e o antígeno foi feito utilizando os PBD disponíveis no banco de dados de proteínas. Para a proteína do envelope E utilizou-se o PDB 3G7T e para o NS1, 4OIG. O critério de escolha dos modelos de interação gerados foi com base na melhor estrutura biologicamente favorável, apresentando maior liberação de energia global livre.

A figura 5 representa a predição estrutural bem como a interação entre os fragmentos de anticorpos e os alvos virais. As estruturas dos clones scFv-E3<sub>V</sub> e scFv-F3<sub>NS1</sub> são representadas pela figura 5A e 5D respectivamente, sendo que os *tags* HA e HIS estão representadas pela cor marrom. As proteínas virais (E e NS1) são demonstradas pelas figuras 5B e 5E. A proteína do envelope viral (5B) apresentam as cores amarela da proteína E, corresponde o domínio DII, e as cores vermelha e azul, evidenciando os domínios DI e DIII, respectivamente.

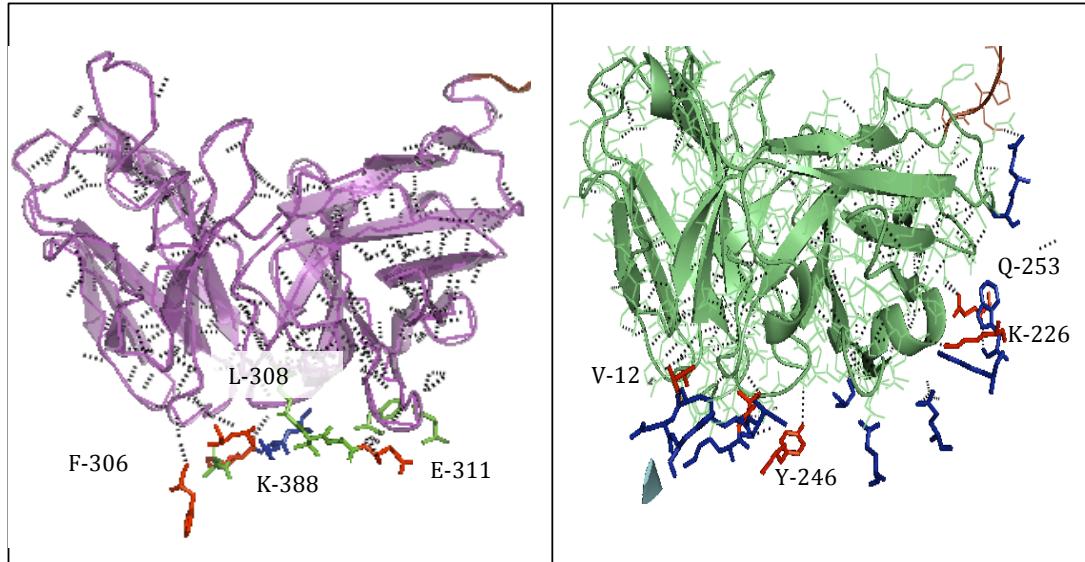


**Figura 5- Docking entre os fragmentos de anticorpos e o alvo viral.** A – predição *in silico* da estrutura do clone scFv-E3. B- Proteína E do vírus da dengue. A cor amarela corresponde o domínio DII, azul, DIII e vermelha, DI . C-interação entre scFv-E3<sub>V</sub> e Proteína E. D - predição *in silico* da estrutura do clone scFv-F3NS1. E – proteína NS1, F- interação entre scFv-F3<sub>NS1</sub> e NS1.

A tabela 1, bem como, a figura 6 apresentam os aminoácidos da proteína E e NS1 que as análises *In Silico* indicaram interagir com os scFv (Fig. 5C e Fig. 5F). A interação entre clone scFv-E3<sub>V</sub> e a proteína E está representada pela cor verde (Fig. 5C). A análise mostrou que a interação do fragmento de anticorpo E3<sub>V</sub> com o domínio DIII envolve 11 aminoácidos, sendo 5 interações fortes do tipo ponte de hidrogênio (ilustrado na figura 6A e os aminoácido foram destacado em negrito e itálico na tabela 1). Já a análise do clone scFv-F3<sub>NS1</sub> mostra uma interação com um total de 17 aminoácidos presente na molécula de NS1 representada pela cor vermelha (Fig. 5F), sendo 5 do tipo ponte de hidrogênio (ilustrado na figura 6B e os aminoácido foram destacado em negrito e itálico na tabela 1).

Tabela 1- Aminoácidos presentes nos alvos virais envolvidos provavelmente na interação com os clones de scFv.

DENGUE 1	Domínio proteína E (3G7T PDB) Domínio DIII
CLONE E3	<b>306-F, 308-L, 311-E, 312-V, 313-A, 314-E, 387-L, 388-K, 390-S, 392-F, 393-K.</b>
DENGUE 1	Proteína NS1 (4OIG PDB)
CLONE F3	<b>12-V, 15-H, 206-E, 209-210- ET, 221-224-KTCI, 226-K, 232- W, 238-E, 245- 246-IY, 247-Y, 253-Q, 351-S</b>



**Figura 6 – Representação do docking da região de interação entre o anticorpo e as proteínas virais.** (A) - Ilustração da interação de hidrogênio entre a estrutura do clone scFv-E3 com os aminoácidos presente no DIII da proteína E. (B) - Ilustração da interação de hidrogênio entre a estrutura do clone scFv-F3<sub>NS1</sub> com os aminoácidos presente na proteína NS1. Em vermelho mostra os possíveis aminoácidos que apresentam uma ligação polar forte com os anticorpos.

A fim de analisar a regiões conservadas do domínio EDIII entre os diferentes sorotipos (1-4), foi feito um alinhamento linear pelo programa clustalW.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

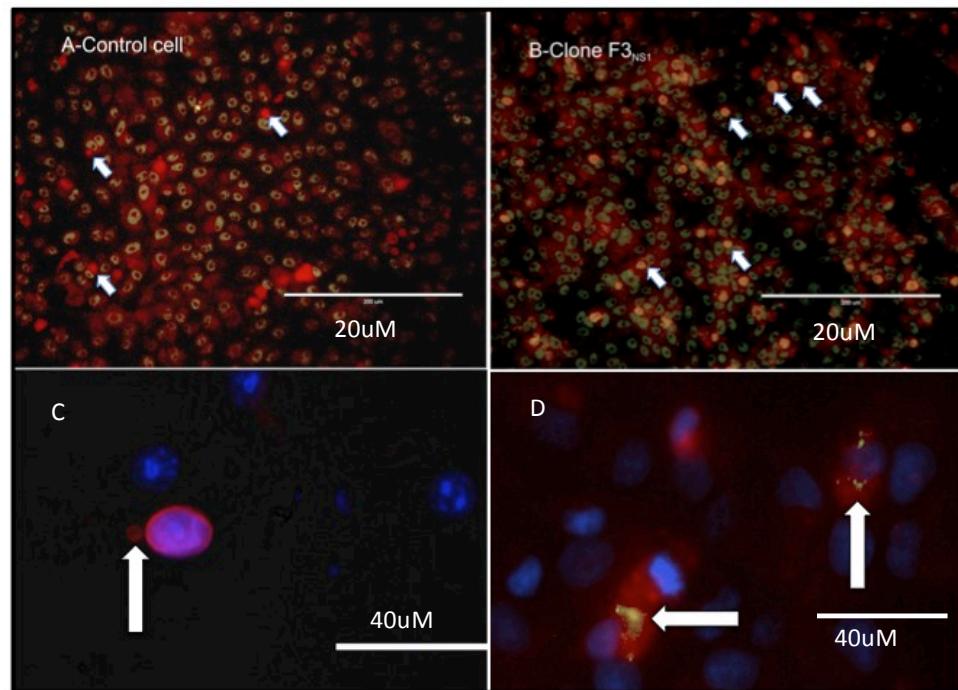
**Figura 7- Alinhamento linear do domínio EDIII dos sorotípos 1-4 da dengue.** As cores representam os aminoácidos que com as características físico-químicas semelhantes. Os símbolos \* e : representam o alinhamento dos mesmo e o grau de semelhança entre aminoácidos, respectivamente.

O resultado do alinhamento revela que os aminoácidos **F**, **E**, **E** e L em que o anticorpo E3<sub>v</sub> interage com a proteína E do envelope são comuns nos 4 sorotipos, sendo que 3 dessas interações são ligações de hidrogênio. Os outros aminoácidos podem ser encontrado em pelo menos em dois sorotipos. A interação do anticorpo com esses aminoácido, possibilita pressupor que o anticorpos poderia reconhecer mais de um sorotipo.

### Co-localização do anticorpo F3<sub>NS1</sub> produzido pela célula e a proteína NS1

Para verificar em qual o compartimento que o anticorpo F3<sub>NS1</sub> produzido pela célula reconhece a molécula de NS1 foi feita uma imuno co-localização. A marcação da proteína NS1 foi feita com o fluoróforo TRITC de coloração vermelha, o anticorpo produzido pela célula foi marcado com FITC e o núcleo foi corado com DAPI. A coloração vermelha presentes em vesículas apontada pela setas brancas representam as regiões onde há acumulo de NS1 viral na célula controle (Figura

6). As célula A1<sub>NS1</sub> produtora de anticorpo F3<sub>NS1</sub> mostraram vesículas de coloração amarela mostrando a sobreposição entre o scFv corado em verde como NS1 corado em vermelho.

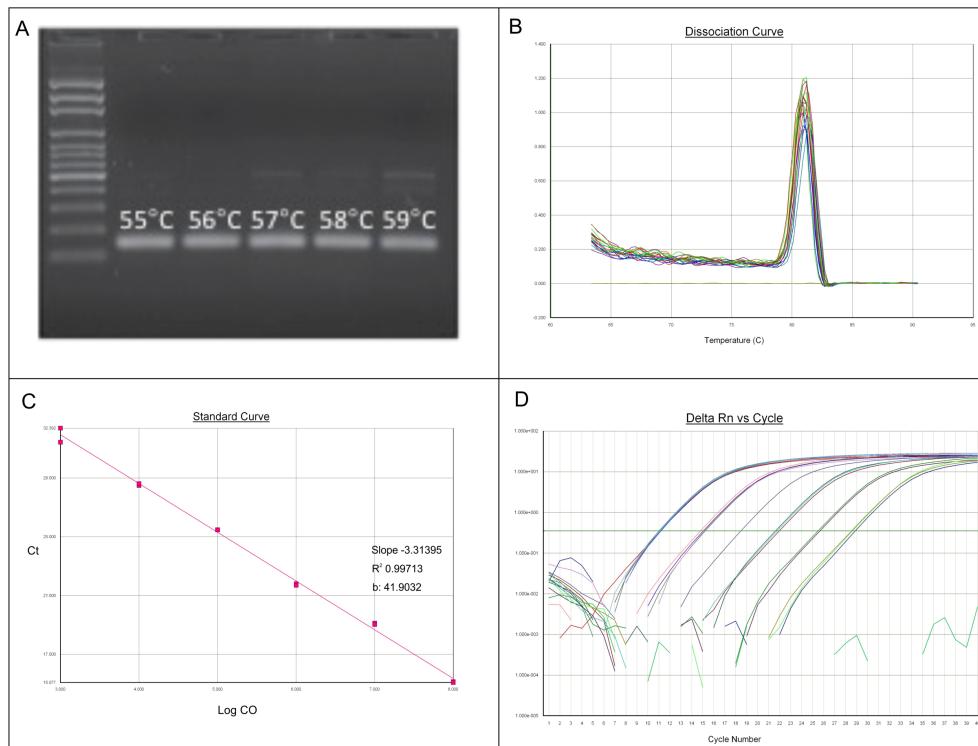


**Figura 8- Imuno co-localização entre o scFv expressos pelas células Vero e a proteína NS1.**  
 A marcação da proteína NS1 foi feita pelo anticorpo primário anti-NS1 e a marcação da expressão do scFv foi feita com anti-HIS, ambos produzidos em camundongo. A detecção fluorescente da proteína NS1 foi feita com anti-IgG de camundongo marcada com TRITIC e a detecção do scFv foi feita com anti-IgG de mouse marcado com FITIC. Neste ensaio foram feitas todas as marcações para detectar a proteína NS1 e posteriormente as marcações para detectar a molécula de scFv nas células controles e no clones celulares infectadas com 1 dia com vírus da dengue 1. A-controle negativo – células que não expressam anticorpo. B- clone celular que expressa o anticorpo F3<sub>NS1</sub>, marcado com FITIC, co-localizado com NS1 marcado com TRITIC. C- Aumento de 40X da célula controle. D- Aumento de 40X da célula celular que expressa o anticorpo F3<sub>NS1</sub>, marcado com FITIC, co-localizado com NS1 marcado com TRITIC.

## Teste da infectividade viral

### Quantificação do título viral por tempo real

Para quantificar as novas partículas virais produzidas foi feito um gradiente de temperatura para a padronização da reação de amplificação do tempo real bem como a mensuração da sua eficiência.



**Figura 7. - Otimização da PCR quantitativa por Tempo Real.** A – Representa a otimização da temperatura de hibridização do primer para a RT-PRC. B- Curva de dissociação pela temperatura do fragmento amplificado. C- Curva de diluição de quantificação absoluta do vírus da dengue. D- Curva Padrão, com Slope =-3,319395 e R<sup>2</sup> =0.997130.

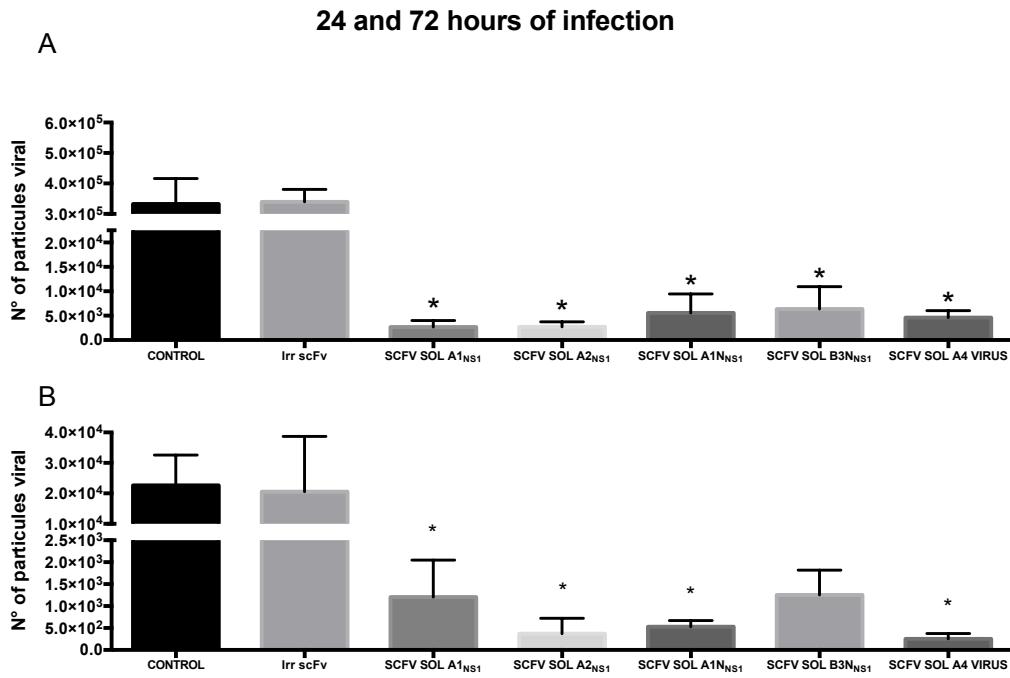
A temperatura escolhida foi de 56 °C (Figura 7A) uma vez que não foi observada a presença de bandas inespecíficas. A Figura 7B revela uma amplificação única do fragmento isolado, uma vez que não indica a presença de outros picos de dissociação, além de uma eficiência de amplificação de 100%,

com  $R^2=0.997130$  (Figura 7D). A figura 7C mostra as curvas de amplificação obtidas na diluição seriada, a qual varia de  $10^8$  a  $10^3$  partículas virais.

### **Teste da atividade anti-viral.**

Para avaliar a inibição da replicação viral mediada pela produção dos fragmentos de anticorpos pelas células Vero, quantificou-se o título do vírus da dengue 1 no sobrenadante da cultura celular por qPCR após a de 24 e 72 horas de cultivo com o vírus, sendo que o título de entrada do vírus da dengue foi de  $4.98E+08$  partículas (Figura 8A e 8B). Após esses períodos, extraiu-se RNA de cada sobrenadante da cultura e realizou-se o qPCR.

Pelo teste de inibição após 24 e 72 horas de cultivo, verificou-se que as células que expressavam os fragmento de anticorpo contra as proteínas virais continham uma quantidade de RNA significativamente menor ( $p<0.001$ ) tanto quando comparado com as células controles como quando comparado com as células transfectadas com plasmídeo contendo scFv irrelevante. A redução do título viral, em ambos os períodos, foi superior a 90% em todas os clones de célula conta o vírus, sendo que os melhores resultados da ação inibitórias foram obtidos após 24 horas de cultivo. Contudo, o clone contra a partícula viral A4<sub>v</sub> foi mais eficiente após 72 horas, propondo que haja um maior efeito protetor a longo prazo.



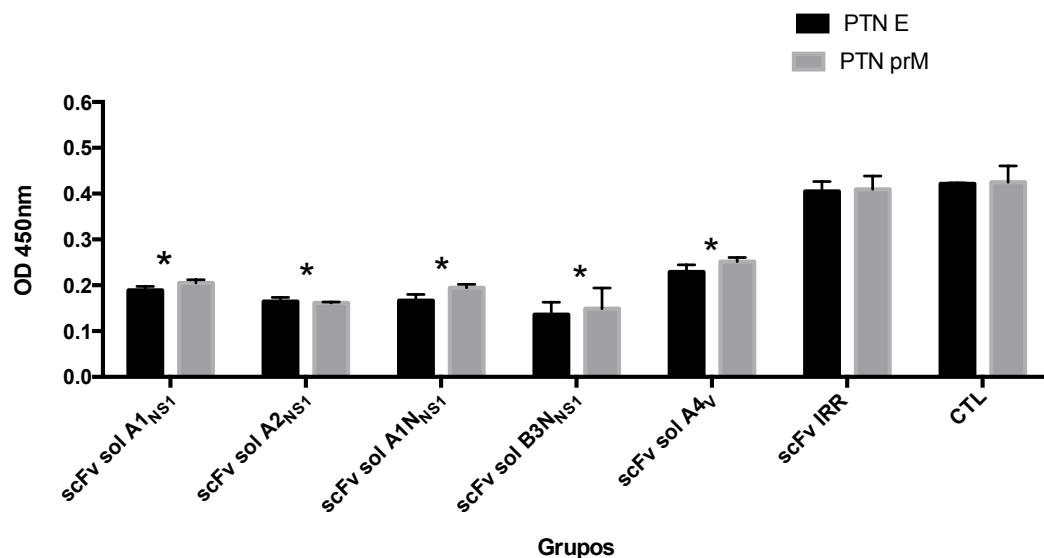
**Figura 8 - qPCR do teste de inibição da replicação viral de 24 e 72 horas.** A - teste de um dia. B- teste de três dia. Células controles, células que expressam scFv irrelevante e clones celulares que expressam scFv contra as proteínas virais foram plaqueados em triplicatas e cultivados em placas de 24 poços durante 24 horas. Posteriormente infectou as células com o vírus da dengue por 1hora, e em seguidas as células foram lavadas uma vez com PBS. O cultivo de novas partículas virais foi feito durante 24 e 72 horas. Extraíu-se RNA do sobrenadante da cultura celular e a titulação das novas partículas virais foi feita por qPCR. O resultado revela que os clones que expressam scFv contra as proteínas do vírus apresentaram uma menor quantidade de partícula viral quando comparado com a célula controle e a célula que expressa o scFv irrelevante. Teste estatístico aplicado foi ANOVA one way com pós-teste Bonferroni.

**Tabela 2- Porcentagem da inibição viral após 24 e 72 horas**

24 horas	Média	inibição (%)	72 horas	Média	inibição (%)
Control	3.33E+05	0.00	control	2.26E+04	0.00
Irr scFv	3.39E+05	-2.00	Irr scFv	2.06E+04	9.10
scFv sol A1 <sub>NS1</sub>	2.67E+03	99.20	scFv sol A1 <sub>NS1</sub>	1.21E+03	94.67
scFv sol A2 <sub>NS1</sub>	2.71E+03	99.19	scFv sol A2 <sub>NS1</sub>	3.71E+02	98.36
scFv sol A1 <sub>N<sub>NS1</sub></sub>	5.55E+03	98.33	scFv sol A1 <sub>N<sub>NS1</sub></sub>	5.28E+02	97.67
scFv sol B3 <sub>N<sub>NS1</sub></sub>	6.38E+03	98.08	scFv sol B3 <sub>N<sub>NS1</sub></sub>	1.25E+03	94.47
scFv sol A4 <sub>V</sub>	4.59E+03	98.62	scFv sol A4 <sub>V</sub>	2.48E+02	98.91

## Quantificação das proteínas E e prM após 24 horas da infecção

Com intuito de analisar a quantidade de proteínas virais 24 horas após a inoculação com o vírus, foi feito a extração total de proteínas da cultura infectada. Foi observado uma redução significativa de proteína E e prM (Figura 9) de todos os clones que expressão anticorpos solúveis comparada à células controles e à células expressando scFv irrelevante.

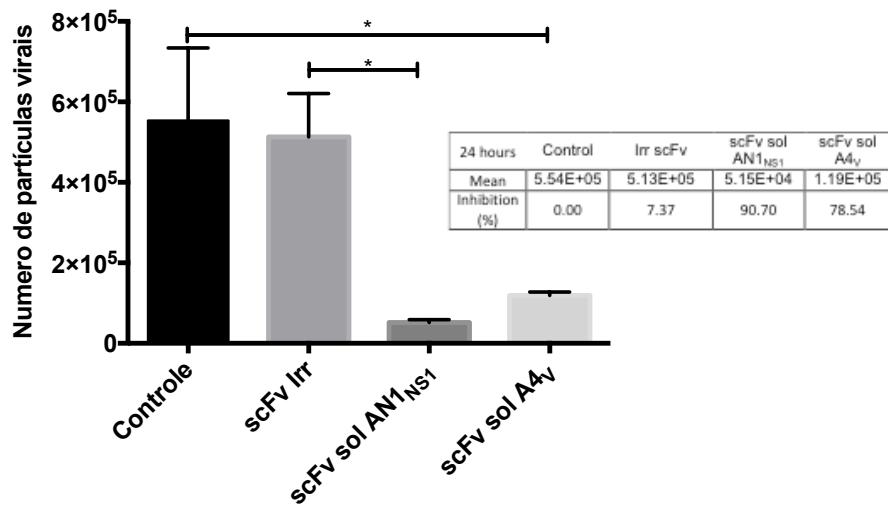


**Figura 9- Quantificação por ELISA das proteínas E e prM após 24 horas de infecção.** Extraíu-se e sensibilizou-se placas carregadas com as proteínas totais das células infectadas com o vírus da dengue 1. Cada poço foram sensibilizados em triplicatas com as proteínas totais das células controles, clone celular irrelevante e com os clones específicos contra o vírus. A presença das proteínas virais E e prM foram detectadas com anticorpos comerciais, anti-E e anti-prM. O símbolo \* representa os clones que obtiveram diferença significativa ( $p<0.001$ ) no teste Anova-Two way com o pós teste Dunnett. Estatística realizado pelo programa GraphPad Prism 6.0. A barra superior mostra a media e desvio padrão da OD492nm de triplicata de amostra independente

## Teste de inibição para o vírus da dengue tipo 2

O teste de inibição foi feito, também, contra o vírus da dengue tipo 2. Os clones A1<sub>NS1</sub> e A4<sub>V</sub> foram testados após 24 horas de inoculação viral.

Os resultados indicam que ambos os clones foram capazes de diminuir significativamente ( $p < 0.003$ ) o título do vírus da dengue tipo 2 comparados às células controles (Fig. 10), com inibição de 78,54% para o clone A4<sub>V</sub> e 90% para o clone A1<sub>NS1</sub>.



**Figura 10- qPCR do teste de inibição da replicação do vírus tipo 2 após 24 horas.** Células controles, células que expressam scFv irrelevante e clones celulares que expressam scFv contra as proteínas virais foram plaqueados em triplicatas e cultivados em placas de 24 poços durante 24 horas. Posteriormente infectou as células com o vírus da dengue 2 por 1 hora, e em seguidas as células foram lavadas uma vez com PBS. O cultivo de novas partículas virais foi feito durante 24. Extraíu-se RNA do sobrenadante da cultura celular e a titulação das novas partículas virais foi feita por qPCR. O resultado revela que os clones que expressam scFv contra as proteínas do vírus apresentaram uma menor quantidade de partícula viral quando comparado com a célula controle e a célula que expressa o scFv irrelevante. Teste estatístico aplicado foi ANOVA one way com pós-teste Bonferroni.

## Discussão

O aumento da prevalência da dengue no mundo tem categorizado esta doença como a maior patologia arboviral durante as últimas décadas<sup>22</sup>. Apesar de haver muita pesquisa biotecnológica sobre a doença, ainda não há uma vacina ou terapia efetiva contra o vírus da dengue<sup>23</sup>. Dessa forma, este trabalho produziu biotecnologicamente uma célula de mamífero capaz de inibir a replicação viral

através da expressão de fragmentos de anticorpos recombinantes específicos para a proteína do envelope e a proteína não estrutural NS1 do vírus da dengue do tipo I.

A seleção dos fragmentos de anticorpos recombinantes foi feita através da metodologia de *Phage Display*, sendo que tanto os fragmentos de anticorpos selecionados contra o vírus quanto contra o NS1 foram capazes de reconhecer significativamente a cultura de célula infectada. Muitos trabalhos têm utilizado a ferramenta de *Phage Display* como um estratégia de produzir anticorpos monoclonais que reconhecem<sup>24</sup>, neutralizam<sup>25</sup> e inibem a replicação<sup>26</sup> de diversos parasitas. Os fragmentos de cadeia simples (scFv) são moléculas derivadas de imunoglobulina, a qual é composta por uma região variável de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve, ligados por um ligante flexível. ScFvs são expressos a partir de um único gene recombinante e retêm a especificidade e a afinidade de ligação<sup>27</sup>.

Os clones scFv-F3<sub>NS1</sub> e scFv-E3<sub>V</sub>, que expressaram os fragmentos de anticorpos e que reconheceram proteínas virais de forma significativa, foram escolhidos para serem sub-clonados em células de mamífero. Uma sequência de DNA de um peptídeo sinal que é traduzido no retículo endoplasmático foi inserido no vetor. A ausência de uma sequência de retenção, no interior da célula, faz com que as moléculas de scFv sejam exportados para o meio extracelular.

Para a sequência de fragmento de anticorpo scFv-F3<sub>NS1</sub> foram selecionados 4 clones celulares, enquanto que para o scFv- E3<sub>V</sub> somente 1 clone celular foi obtido. A reatividade significativa dos clones que expressaram o scFv e a presença de uma banda diferencial de 25 KDa dos clones, quando comparadas com as células controle, certificam a produção do anticorpo na forma solúvel. A

ligação dos anticorpos com as proteínas E e NS1 também foi verificada por ELISA. Os anticorpos solúveis, produzidos pela célula de mamífero, foram capazes de reconhecer significativamente os抗ígenos virais semelhantemente aos anticorpos comerciais como anti-E, anti-prM e anti-NS1.

A determinação das possíveis regiões de ligação entre o alvo viral e o anticorpos foi analisada *in Silico*, por meio do *docking* das moléculas. *Docking* molecular é um procedimento de simulação computacional capaz de predizer o complexo multi-molecular de duas estruturas individuais<sup>28</sup>. Apesar do *docking* de proteína-proteína ser conhecido por gerar problemas de interação, pesquisadores têm mostrado que esses problemas não se aplicam para os modelos de anticorpos, já que os eles são modelados com alta acurácia e precisão<sup>28-30</sup>. Após a predição, a proteína E foi escolhida para realizar a interação com o anticorpo. Esta proteína exposta a superfície é a que possui maior tamanho dentre todas as proteínas virais, além de ser crucial para a ligação do vírus da dengue na célula do hospedeiro. Por ter um papel importante para a montagem, entrada, ela tem sido considerada o principal alvo de neutralização dos anticorpos anti-flavivirus<sup>9</sup>.

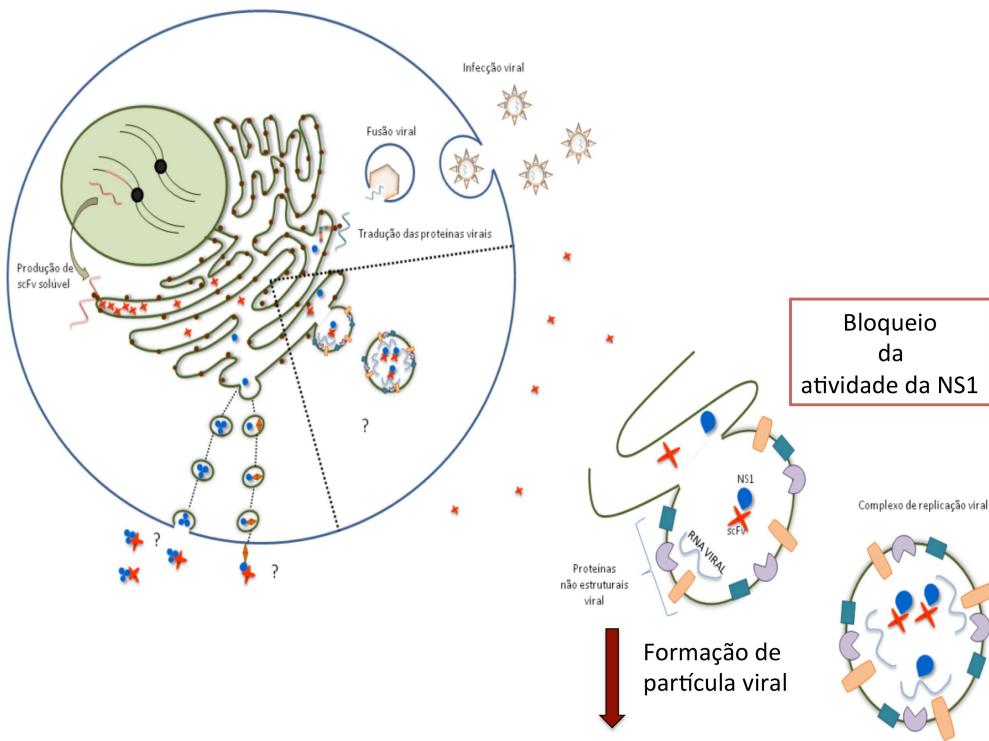
31-33

Por meio do *docking* molecular entre scFv-E3<sub>V</sub> e a proteína E verificou-se que o fragmento do anticorpo interage com o domínio DIII do vírus, sendo que algumas são consideradas ligações fortes do tipo pontes de hidrogênio.

O teste da inibição realizado com as células que expressam o scFv-E3<sub>V</sub> e infectadas com o vírus revelou que o fragmento do anticorpo diminui o título viral do sobrenadante da cultura após 24 e 72 horas de cultivo. A inibição viral poderia ser explicada pelo bloqueio da entrada ou a fusão do vírus a célula pelo anticorpo, uma vez que o scFv pode interagir com domínio DIII, o qual é responsável

pela interação do vírus com o receptor ou com a superfície glicosaminoglicano na superfície da célula<sup>34,7</sup>, como revelado pela análise *in Silico*. Além disso, um possível bloqueio conformacional, proporcionado pela ligação do anticorpo à proteína E, poderia também promover a diminuição da infectividade viral.

A análise *in Silico* mostrou que o anticorpo scFv-F3<sub>NS1</sub> pode interagir com a molécula de NS1 fortemente com o anticorpo através da ponte de hidrogênio. Essa interação do anticorpo com NS1 poderia também explicar a inibição do título viral após durante 24 a 72 horas do cultivo com o vírus. Embora o papel desta molécula não estrutural ainda não tenha sido totalmente elucidada, tem sido descrita como proteína auxiliadora da replicação viral<sup>35, 36</sup>. Além disso, a co-localização observada do anticorpo scFv-F3<sub>NS1</sub> com a proteína NS1 no interior de vesículas no citoplasma celular, poderia explicar, também, a diminuição do título viral, através da ligação do anticorpo com NS1 intracelular no complexo de replicação, a inibindo a função dessa molécula não estrutural. A diminuição da quantidade de proteínas virais também reforça os dados que o anticorpo poderia inibir as atividades de replicação no interior do complexo de replicação viral (Figura 11).



**Figura 11- Modelo de inibição da replicação viral via bloqueio da NS1 através da interação scFv-NS1.** A figura em azul representa a molécula de NS1 e o X em vermelho representa o scFv. O nosso modelo sugere que o scFv produzido no interior do retículo poderia encontrar a molécula de NS1 também traduzida no RE e inibir a replicação do RNA viral no interior do complexo de replicação viral, diminuindo a formação de novas partículas virais

Outros trabalhos também têm mostrado a interferência da replicação viral pela produção de anticorpo anti-NS1 contra o vírus da dengue<sup>26, 36</sup>. Além disso, o uso de terapias com anticorpos capazes de neutralizar o vírus tem sido amplamente aplicado contra diversos patógenos<sup>37-40</sup>.

Os melhores clones que apresentaram uma inibição eficiente na replicação do vírus da dengue tipo também foram testados contra o sorotipo 2. Como observado para a dengue tipo 1, o resultado também mostrou uma redução na replicação viral após 24 horas, principalmente, tanto para o clone contra a proteína E e contra a NS1. As sequências de aminoácidos conservadas em que o scFv se interage com a molécula de proteína E do vírus verificada pelo clustalw poderia

explicar o motivo pelo qual um anticorpo selecionado contra o sorotipo 1 conseguiria inibir o sorotipo 2. Contudo, a maior conservação da sequencia da proteína NS1 entre os subtipos da dengue poderia ser a razão pelo qual o clone conseguiu inibir melhor o sorotipo 2 quando comparado com a proteína E, o que mostra a potencialidade de ambos os anticorpos.

Dessa forma, a produção de anticorpos inibidores da replicação viral tem se mostrado ser uma boa alternativa terapêutica para o combate da replicação viral. Esta estratégia pode ser aplicada juntamente com a profilaxia que é recomendada pelo Ministério da Saúde, para se obter bons resultados no combate da disseminação da dengue em todo o mundo.

## **Material e Métodos:**

### **1. *Biopanning* peptídeos ligantes a proteínas NS1 e proteína do envelope**

Para a seleção de anticorpos ligantes as proteínas virais, uma biblioteca de scFv com peptídeos fusionados a proteína pIII foi utilizada<sup>42</sup>. Todo o *biopanning* foi realizado de acordo com o protocolos de Barbas et al, 2001<sup>43</sup>, com algumas modificações.

Poços de uma placa foram sensibilizados com 1 µg de anticorpos anti-NS1 (Abcam – ab41616) e anti-proteína E (Abcam-ab41349) durante 16h a 4°C. Posteriormente, a placa foi bloqueada com TBS-BSA 3%. Os poços foram incubadas por 1 hora a 37°C com o sobrenadante da cultura de C6/36 infectada com vírus da dengue para a captura da proteína NS1 e da partícula viral. Em seguida os poços foram lavados 5 vezes com TBS 0.05% de Tween-20 (PBS-T) para a remoção das proteínas não ligantes.

A biblioteca amplificada (100 µL/poco) de scFv foi adicionada aos poços e

incubados por 1h a 37°C. Após a este período, os poços foram lavados 10 vezes com TBS 0.05% de Tween-20 (PBS-T). Os clones foram eluídos com glicina 1M pH= 2.5 por 10 minutos. Os clones eluídos foram titulados e amplificados em meio SB como descrito anteriormente para a realização até o terceiro ciclo.

Após o terceiro ciclos os fagos foram amplificados em bactéria XL1-Blue *overnight* sem a adição do fago *helper*, com intuito de aumentar a quantidade do plasmídeo que contem os insertos de scFv. Realizou-se a extração do DNA plasmidial da bactéria infectada com os fagos do segundo ciclo pelo kit de Miniprep (Qiagen-27106), seguido da eletroporação do DNA plasmidial em bactéria TOP-10 F' eletrocompetentes. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo acrescido de 2% (v/v) de glicose 2M e carbenicilina a 50 µg/mL e incubadas a 37°C por 16 horas.

### **1.1. Produção de scFv na forma solúvel para dos clones do biopanning**

Em uma placas do tipo *deep well* de 96 poços foi adicionado, a cada poço, 1 mL de meio SB contendo carbenicilina a 50 µg/mL e 2% (v/v) de glicose 2M, seguido pela inoculação de colônia de bactérias TOP10 transformadas com a biblioteca de scFv advinda do *biopanning*. A placa foi selada com filme plástico, sendo o mesmo perfurado para permitir a aeração, seguido pela incubação por 14 horas a 37°C e 300 rpm. No dia seguinte, 50 µL de cultura de cada poço contendo clone de scFv foram transferidos para outra placa contendo, novamente, 1 mL por poço de meio SB acrescido de carbenicilina a 50 µg/mL e 2% (v/v) de glicose 2M. A placa foi selada, perfurada e incubadas por 4 horas a 37°C e 300 rpm. Após incubação por 4 horas, a placa foi centrifugada a 3.700 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Os pellet de bactérias foi então ressuspandido em 1

mL de meio SB contendo 50 µg/mL de carbenicilina (Sigma-C1389) e 2,5mM de IPTG (Sigma - I6758-5G). A placas foi, novamente, incubada por 18 horas a 30°C e 300 rpm, e no dia seguinte foi submetida à centrifugação a 3.700 rpm durante 15 minutos a 4°C, o pellet foi estocado com glicerol 25% a -20°C e o sobrenadante contendo as moléculas scFv na forma solúvel foi transferido para outra placa e armazenado a 4°C por até ser utilizado nos ensaios de ELISA contra as proteínas virais.

### **1.2. ELISA para a seleção dos clones mais reativos**

Para selecionar os fagos mais reativos ligantes das proteínas virais, foi feito ensaio de imuno-adsorção por ligação enzimática (ELISA). Uma placa carregada de 96 poços (Maxsorp-NUC- 44-2404-21) foi sensibilizada com o sobrenadante de cultura de C6/36 infectada com o vírus da dengue na proporção de 1 µL para cada 10 µL do tampão de sensibilização Bicarbonato carbonato 0.1M pH 9.6. Em seguida, bloqueou-se a placa com o tampão de PBS-BSA3% por 2 horas a temperatura ambiente. Lavou-se 3 vezes a placa com PBST 0.05% *Tween* e adicionou os sobrenadantes dos fagos, o qual ficou incubando por mais 2 horas a 37°C. Foi feito 3 lavagens com PBST 0.05% de *Tween* e posteriormente adicionou-se o anticorpo anti-HA (Roche- 12013819001) marcado com peroxidase na diluição 1:2500 por 1 hora a 37°C. Lavou-se, novamente, a placa 5 vezes com PBST 0.05% de *Tween* e em seguida a mesma foi revelada com SigmaFast™ OPD (Sigma-Aldrich - P9187-50SET). A reação foi finalizada utilizando-se 20 µL/poço de ácido sulfúrico 4N. A leitura foi feita em leitor de microplaca (ThermoPlate) a 492 nm.

## **2. Análise de Sequenciamento e Bioinformática:**

O sequenciamento das cadeias leve e pesada da biblioteca de anticorpos e dos clones selecionados após o *biopanning* foi realizado utilizando o kit *DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare-US81070) e o seqüenciador automático capilar MegaBaceTM 1000 (GE Healthcare). O DNA dos clones selecionados foram extraídos de bactérias TOP10 utilizando-se o kit Miniprep (Qiagen-27106), seguindo-se as recomendações do fabricante.

As amostras foram preparadas em placas de 96 poços contendo aproximadamente 500 ng de DNA plasmidial e 2,5 picomoles do oligonucleotídeo MMB4 (senso) ou 2,5 picomoles do oligonucleotídeo MMB5 (reverso) em um volume final de 10 µL.

As reações foram precipitadas com o kit de seqüenciamento conforme recomendações do fabricante e as placas foram injetadas imediatamente no seqüenciador automático.

As sequências de DNA foram analisadas no programa de IgBlast sequence <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/oldigblast/> o qual gerou as sequências de aminoácidos da cadeia leve VL e de cadeia pesada VH.

Foi feita a predição estrutural dos anticorpos selecionados, pelo programa Raptorx ([www. http://raptorx.uchicago.edu/](http://raptorx.uchicago.edu/)) gerando um arquivo PDB.

O docking entre os scFv e a proteína do envelope do vírus foi avaliada pelo programa Pathdock ([www. http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/](http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/)). Escolheu-se as melhores avaliações com base melhores menor delta G.

### **3. Produção de scFv solúvel expresso pelas células Vero.**

Para a produção de scFv solúvel, foram utilizado os seguintes primers e oligonucleotídeos (SEC sequence):

Sistema de scFv solúvel	
Forward (enzima de restrição Xhol)	5'- atgtctcgagGGTTTCGCTACCGTGGCCCAG -3'
Reverso (enzima de restrição EcoRI)	5'-atga <u>gaattc</u> CTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG CTG GCC-3'

SEC sequence com fragment de KOZAC	
Oligo forward (5`- HindIII e 3`-Xhol)	5'- AGCTTcacaATGGGCTGGAGCCTGATCCTCCTGTTCT CGTCGCTGTGGCTACAGGTc-3'
Oligo reverso (5`- Xhol e 3`- HindIII)	5'- tcgagACCTGTAGCCACAGCGACGAGGAACAGGAGGAT CAGGCTCCAGCCCCATtgtgA-3

Os *primers* amplificaram as sequências de scFv contidas no vetor pComb 3XSS, e as sequências amplificadas foram corridas no gel de agarose 1% e purificadas pelo kit QIAquick Gel Extration (Qiagen- 28706). Em seguida, as sequências foram clonadas no vetor *pGem-t easy* (Promega –A1360) conforme o manual do fabricante e transformado na bactéria DH-10B eletrocompetente, plaqueados em meio LB ágar contendo ampicilina (10µg/mL) como antibiótico de seleção e as colônias foram crescidas em meio LB contendo o mesmo antibiótico para a amplificação dos inserto. Foi feito a extração do plasmídeo com o kit Miniprep (Qiagen-27106) e quantificado pelo espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop). O inserto foi cortado usando as enzimas Xhol (New England - R0146L) e EcoRI (New England - R0101S) e congelado a -20°C. Realizou-se, também, o anelamento dos oligonucleotídeos no tampão de anelamento (10 mM Tris, pH 7.5–8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA). Neste procedimento, misturou-se 150mM do oligo *forward* e 150mM do oligo *reverse* no tampão em um tubo de 0.6mL no volume final de 100µL e em seguida, aqueceu a solução até a temperatura de 95°C por 5 minutos, e deixou o tubo a chegar a temperatura

ambiente. Posteriormente, 100pmol da solução de oligo foi fosforilado utilizando a enzima T4 kinase (Promega- M1801), conforme a reação abaixo, a temperatura de 37°C por 1 hora.

Para a clonagem utilizou-se o vetor pcDNA3-scFv9E1-SV5-SEL1L (Vecchi, 2012). O vetor foi digerido com HindIII (New England - R0104T) e EcoRI (New England - R0101S), para a clonagem do scFv na forma solúvel. Foi feita uma reação de ligação tripla entre os oligos de peptídeo sinal, os insertos de scFv e o vetor, durante 16 h a 4°C.

O plasmídeo foi transformado em bactéria DH10-B eletrocompetente e plaqueado em meio LB ágar contendo ampicilina como antibiótico de seleção. Em seguida, colônias de bactérias foram crescidas em meio LB líquido contendo ampicilina (10µg/mL) durante 16 horas e feita a extração do plasmídeo com o kit Miniprep da Qiagen (Qiagen-27106) e quantificado pelo espectofotometro ND-1000 (NanoDrop).

#### **4. Linhagens celulares e transfecção**

As células das linhagens C6/36 (*Aedes albopictus*) e Vero foram gentilmente cedidas pelo departamento de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia. As células C6/36 foram cultivadas em meio Leibowitz 15 (L-15) (Gibco- 11415-056) suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco-10082-139), triptose fosfato (Invitrogen-T8782), aminoácidos essenciais (Invitrogen- 11130-051), gentamicina (Invitrogen- 15750-078). As células foram mantidas a 28°C. A linhagem Vero (ATCC CRL-1651) foi cultivada em meio DMEM (Gibco- 11965-118) suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco-10082-139), e gentamicina (Invitrogen- 15750-078). As linhagens foram utilizadas para o cultivos de vírus e

para as clonagens do sistema de degradação do vírus da dengue.

As células Vero foram plaqueadas com  $2 \times 10^5$  célula por poço em placa de 24 poços contendo DMEM 10% de SFB durante 16 horas. Para as soluções de transfecção, 500ng do plasmídeo contendo o vetor de expressão do scFv solúvel foi diluído em 50 $\mu$ L meio DMEM incomplete e posteriormente em outra solução contendo 2 $\mu$ L de lipofectamina 2000 (Invitrogen- 11668-027) 50 $\mu$ L DMEM incompleto. Ambas as soluções foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. As células plaqueadas foram lavadas 1 vez com PBS 1X e adicionou-se a solução de DNA, lipofectamina nos poços. As células foram incubadas com a solução por 16 horas, e em seguida, lavadas com PBS 1X. Acrecentou-se meio DMEM completo com 0,9 $\mu$ g/ml de geneticina (G-418) (Invitrogen- 10131027) por poço para a seleção de clones de células transfetadas.

Após 14 dias os clones de células foram isoladas com papel de filtro *Whatman* cortado e tripsina, e colocados em placas de 96 poços contendo meio DMEM completo acrescido de 0,9 $\mu$ g/ml de G-418.

Os clones que expandiram foram tripsinizados e repassados para uma placa de 24 poços e, em seguida, iniciou-se os testes para verificar a expressão das proteínas do sistema de degradação.

##### **5. Extração de RNA viral e Produção de cDNA viral**

As células C6/36 (*Aedes albopictus*) foram infectadas com os vírus da dengue tipo 1 e tipo 2 seguida pela extração do RNA viral feito com Trizol seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen- 15596-018).

O RNA viral foi submetido a transcrição reversa (RT) (Invitrogen- 28025-021) nas condições recomendadas pelo Fabricante.

### **5.1. Construção da Curva e Clonagem**

Os primers para a construção da curva e quantificação viral foram desenhados utilizando os acessos do NCBI n° AAD11533.1 e n° ADW16025.1. Os primers desenhados foram 5'-GAACATTTCGGAAGCTT-3' (forward) e 5' - CTCGCGCGTTTCAGCATATTGA-3' (reverse).

Os cDNAs gerados pela RT submetidos a reação em cadeia de polimerase (PCR) e os fragmentos amplificados foram submetidos a etroforese em gel de agarose 1%. Para a purificação da banda utilizou-se o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen- 28706). Os fragmentos foram clonados no vetor pGEM *t*-easy (Promega-A1360). O plasmídeo foi inserido na linhagem da bactéria *Ecoli* DH10-B e plaqueado em meio LB ágar contendo ampicilina (10µg/mL) (Invitrogen- 11593-027 como antibiótico de seleção. O plasmídeo foi purificado utilizando o kit Miniprep (Qiagen-27106) e quantificado pelo espectofotometro ND-1000 (NanoDrop). Todos os procedimentos realizados foram feitos de acordo com as instruções do fabricante.

Para confirmar a inserção do fragmento no plasmídeo, foi realizado uma PCR seguida por sequenciamento. O plasmídeo foi digerido pela enzima de restrição EcoRI (New England - R0101S) para certificar-se do inserto clonado. Para o cálculo do número de cópias utilizou-se a equação abaixo segundo Godornes et al, 2007<sup>41</sup>.

$$\text{Cópias}/\mu\text{L} = \frac{\text{6.02} \times 10^{13} \text{ cópias} \times \text{a concentração do plasmídeo g}/\mu\text{L}}{\text{Número de bases} \times 660 \text{ daltons}}$$

### **6. Verificação da expressão do sistema por SDS-PAGE e ELISA.**

Os sobrenadantes de cada cultura foram coletados após 5 dias de cultura de células Vero transformadas e selecionadas com G-418. Foram fervidas 20 µL do

sobrenadante de cada cultura, incluindo a cultura de célula controle (sem transfecção), em tampão de amostra (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,5% SDS, 10% glicerol, 0,002% de bromo azul de fenol e 0,7135M β-mercaptoethanol). As amostras foram corridas no Gel SDS PAGE 12% e coradas com Comassie-R.

Para analisar a expressão em ELISA, sensibilizou-se uma placa carregada (Maxsorp-NUNC) com 20 µL do sobrenadante de cada cultura, incluindo a cultura de célula controle em tampão Bicarbonato-Carbonato pH=9,0 por 16 horas a 4°C. A placa foi bloqueada com PBS-BSA 5% por 1 hora a 37°C e em seguida lavada 3X com PBS-T 0,05%. Colocou-se o anti-His (1:2500) (GE Healthcare- 27-4710-01) por 1 hora a 37°C e a placa foi novamente lavada para a adição do anti-mouse marcado com peroxidase (Sigma- A2554-1ML). A placa foi revelada com SigmaFast™ OPD (Sigma-Aldrich - P9187-50SET). A reação foi finalizada utilizando-se 20 µL/poço de ácido sulfúrico 4N. A leitura foi feita em leitor de microplaca (ThermoPlate) a 492 nm.

Para a análise do reconhecimento da cultura infectada em ELISA, sensibilizou-se uma placa carregada (Maxsorp-NUNC) com 20 µL do sobrenadante de cultura infectada e não infectada em tampão Bicarbonato-Carbonato pH=9,0 por 16 horas a 4°C. A placa foi bloqueada com PBS-BSA 5% por 1 hora a 37°C e em seguida lavada 3X com PBS-T 0,05%. Colocou-se anticorpos comerciais (anti-NS1, proteína do envelope e proteína prM) de acordo com o fabricante (abcam) e o sobrenadante dos clones celulares que expressão scFv solúvel por 1 hora a 37°C. A placa foi novamente lavada e nos poços que continham o anticorpo comercial foi colocado PBS 1X e nos scFv solúvel, adicionou-se anti-HIS (GE). Lavou-se a placa e incubou-a com anti-mouse marcado com peroxidase e (Sigma- A2554-1ML). A placa foi revelada com SigmaFast™ OPD (Sigma-Aldrich - P9187-

50SET). A reação foi finalizada utilizando-se 20 µL/poço de ácido sulfúrico 4N. A leitura foi feita em leitor de microplaca (ThermoPlate) a 492 nm.

## **7. Imuno co-localização do scFv anti-NS1 e NS1**

As células Vero foram plaqueada em  $1,5 \times 10^5$  célula por poço em uma placa de 24 poços contendo uma lamínula circular em DMEM 10% de SFB durante 16 horas. Em seguida, os poços foram lavados uma vez com PBS 1x e adicionado  $1,92 \times 10^{10}$  partículas virais por 1 hora a 37°C sob gentil agitação. Após este período, as células foram lavados uma vez com PBS 1x e adicionado DMEM 10% de SFB, para a incubação por 24 horas.

Permeabilizou-se e fixou-se as células com 100 µL com a solução Cytofix/Cytoperm solution (BD- 555028) por 30 minutos a 4°C. Lavou-se 2 vezes os poços contendo as células com BD Perm/Wash solution 1X, e *incubou* as células com anti-His na proporção de 1:50 por 1 hora a temperatura ambiente. As lamínulas contendo as células foram lavadas se 2 em BD Perm/Wash solution 1X e incubadas com anti-IgG de mouse marcado com FITC (Sigma) na proporção de 1:50 por 1 hora a TA na ausência de luz. Lavou-se novamente 2 vezes com BD Perm/Wash solution 1X e as células foram incubadas com anti-NS1 e anti-proteína E na proporção 1:50 por 1 hora a TA. Lavou-se novamente as lamínulas e adicionou-se anti-IgG de mouse marcado com TRITC (Sigma) juntamente com DAPI na proporção 1:50 por 1 hora a TA. As células foram analisadas no microscópio de fluorescência EVOS.

## **8. Validação do sistema por PCR em Tempo Real**

Após a certificação da produção do scFv solúvel as células foram testadas para certificar a funcionalidade de inibir a replicação do vírus.

Para este teste os clones foram plaqueados em triplicate com  $2 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços por 16 horas em estufa de cultura celular. Os clones com scFv irrelevante e as células vero não transfectadas foram utilizadas como controle do sistema.

As células foram incubadas com o vírus da dengue na  $1,92 \times 10^{10}$  partículas virais por 1 hora a 37°C sob gentil agitação. Posteriormente, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X, e adicionado 250 µL de meio DMEN completo com 3% SFB sem o antibiótico. A produção de novas partículas virais foi verificada após 24 horas e 72 horas.

Para análise de produção de novas partículas virais, extraiu-se o RNA dos 250 µL do sobrenadante dos poços com TRizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, e em seguida realizou-se a RT-PCR de acordo com o protocolo descrito no item de construção da curva do Tempo Real.

As amostras foram analisadas em Syber Green (Life Technologies) em duplicada no aparelho de tempo 7500 Real Time PCR System (Applied System). A temperatura de anelamento e extensão foi de 56°C em 40 ciclos.

## 9. Análise estatística

Para as análises estatísticas foram utilizadas o programa GraphPad Prism 6. Para analisar a diferença das medias entre os grupos foi utilizado a ferramenta de variância de múltiplo teste-t com pós teste Holm- Sidak, teste-t e ANOVA com pós-teste Bonferroni.

## Referências

- WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.

2. Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science* 2013; 342:415.
3. Chambers TJ, Liang Y, Droll DA, Schlesinger JJ, Davidson AD, Wright PJ, et al. Yellow fever virus/dengue-2 virus and yellow fever virus/dengue-4 virus chimeras: biological characterization, immunogenicity, and protection against dengue encephalitis in the mouse model. *Journal of virology* 2003; 77:3655-68.
4. Chambers TJ, Monath TP. Preface to the flaviviruses. *Advances in virus research* 2003; 60:ix-xi.
5. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:518-28.
6. Gebhard LG, Filomatori CV, Gamarnik AV. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses* 2011; 3:1739-56.
7. Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 2001; 75:7769-73.
8. Huang CY, Butrapet S, Moss KJ, Childers T, Erb SM, Calvert AE, et al. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. *Virology* 2010; 396:305-15.
9. Pierson TC, Fremont DH, Kuhn RJ, Diamond MS. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. *Cell host & microbe* 2008; 4:229-38.
10. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 2004; 427:313-9.
11. Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:8003-8.
12. Fan J, Liu Y, Yuan Z. Critical role of Dengue Virus NS1 protein in viral replication. *Virologica Sinica* 2014.
13. del Angel RM, Reyes-del Valle J. Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet. *PLoS pathogens* 2013; 9:e1003551.
14. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nature immunology* 2009; 10:116-25.
15. Brandler S, Tangy F. Vaccines in development against West Nile virus. *Viruses* 2013; 5:2384-409.
16. Dayan GH, Pugachev K, Bevilacqua J, Lang J, Monath TP. Preclinical and clinical development of a YFV 17 D-based chimeric vaccine against West Nile virus. *Viruses* 2013; 5:3048-70.
17. Halstead SB, Thomas SJ. Japanese encephalitis: new options for active immunization. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2010; 50:1155-64.
18. VanBlargan LA, Mukherjee S, Dowd KA, Durbin AP, Whitehead SS, Pierson TC. The type-specific neutralizing antibody response elicited by a dengue vaccine candidate is focused on two amino acids of the envelope protein. *PLoS pathogens* 2013; 9:e1003761.
19. Lazo L, Izquierdo A, Suzarte E, Gil L, Valdes I, Marcos E, et al. Evaluation in mice of the immunogenicity and protective efficacy of a tetravalent subunit vaccine candidate against dengue virus. *Microbiology and immunology* 2014; 58:219-26.
20. Yauch LE, Shresta S. Dengue virus vaccine development. *Advances in virus research* 2014; 88:315-72.
21. Danko JR, Beckett CG, Porter KR. Development of dengue DNA vaccines. *Vaccine* 2011; 29:7261-6.

22. Reyes-del Valle J, Salas-Benito J, Soto-Acosta R, del Angel RM. Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. *Current Tropical Medicine Reports* 2014; 1:36-43.
23. Williams KL, Sukupolvi-Petty S, Beltramello M, Johnson S, Sallusto F, Lanzavecchia A, et al. Therapeutic efficacy of antibodies lacking Fc gamma receptor binding against lethal dengue virus infection is due to neutralizing potency and blocking of enhancing antibodies [corrected]. *PLoS pathogens* 2013; 9:e1003157.
24. Meyer T, Schirrmann T, Frenzel A, Miethe S, Stratmann-Selke J, Gerlach GF, et al. Identification of immunogenic proteins and generation of antibodies against *Salmonella Typhimurium* using phage display. *BMC biotechnology* 2012; 12:29.
25. Carlsson F, Trilling M, Perez F, Ohlin M. A dimerized single-chain variable fragment system for the assessment of neutralizing activity of phage display-selected antibody fragments specific for cytomegalovirus. *Journal of immunological methods* 2012; 376:69-78.
26. Poungpair O, Bangphoomi K, Chaowalit P, Sawasdee N, Saokaew N, Choowongkamon K, et al. Generation of human single-chain variable fragment antibodies specific to dengue virus non-structural protein 1 that interfere with the virus infectious cycle. *mAbs* 2014; 6:474-82.
27. Worn A, Pluckthun A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *Journal of molecular biology* 2001; 305:989-1010.
28. Simonelli L, Beltramello M, Yudina Z, Macagno A, Calzolai L, Varani L. Rapid structural characterization of human antibody-antigen complexes through experimentally validated computational docking. *Journal of molecular biology* 2010; 396:1491-507.
29. Pedotti M, Simonelli L, Livoti E, Varani L. Computational docking of antibody-antigen complexes, opportunities and pitfalls illustrated by influenza hemagglutinin. *International journal of molecular sciences* 2011; 12:226-51.
30. Simonelli L, Pedotti M, Beltramello M, Livoti E, Calzolai L, Sallusto F, et al. Rational engineering of a human anti-dengue antibody through experimentally validated computational docking. *PloS one* 2013; 8:e55561.
31. Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral research* 2008; 80:11-22.
32. Arjona A, Ledizet M, Anthony K, Bonafe N, Modis Y, Town T, et al. West Nile virus envelope protein inhibits dsRNA-induced innate immune responses. *Journal of immunology* 2007; 179:8403-9.
33. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2012; 55:289-95.
34. Watterson D, Kobe B, Young PR. Residues in domain III of the dengue virus envelope glycoprotein involved in cell-surface glycosaminoglycan binding. *The Journal of general virology* 2012; 93:72-82.
35. Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 1996; 220:232-40.
36. Yodsheewan R, Maneewatch S, Srikanote P, Thueng-In K, Songserm T, Dong-Din-On F, et al. Human monoclonal ScFv specific to NS1 protein inhibits replication of influenza viruses across types and subtypes. *Antiviral research* 2013; 100:226-37.
37. Edeling MA, Austin SK, Shrestha B, Dowd KA, Mukherjee S, Nelson CA, et al. Potent dengue virus neutralization by a therapeutic antibody with low monovalent affinity requires bivalent engagement. *PLoS pathogens* 2014; 10:e1004072.
38. Gach JS, Achenbach CJ, Chromikova V, Berzins B, Lambert N, Landucci G, et al. HIV-1 specific antibody titers and neutralization among chronically infected patients on long-term suppressive antiretroviral therapy (ART): a cross-sectional study. *PloS one* 2014; 9:e85371.
39. Hussack G, Arbab-Ghahroudi M, van Faassen H, Songer JG, Ng KK, MacKenzie R, et al. Neutralization of *Clostridium difficile* toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding domain. *J Biol Chem* 2011; 286:8961-76.

40. Daffis S, Kontermann RE, Korimbocus J, Zeller H, Klenk HD, Ter Meulen J. Antibody responses against wild-type yellow fever virus and the 17D vaccine strain: characterization with human monoclonal antibody fragments and neutralization escape variants. *Virology* 2005; 337:262-72.
41. Godornes C, Leader BT, Molini BJ, Centurion-Lara A, Lukehart SA. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine* 2007; 38:1-7.
42. Carneiro AP, Reis CF, Morari EC, Maia YC, Nascimento R, Bonatto JM, et al. A putative OTU domain-containing protein 1 deubiquitinating enzyme is differentially expressed in thyroid cancer and identifies less-aggressive tumours. *British journal of cancer* 2014.
43. Barbas CF. Phage display : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

## **CAPÍTULO III**

**INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL VIA DEGRADAÇÃO  
PROTEASOMAL DE PROTEÍNA ESPECÍFICA DO VÍRUS DA DENGUE**

**Revista: Journal of Virology**

**Título: Inibição da replicação viral via degradação proteasomal de proteína específica do vírus da dengue.**

**Resumo:**

A dengue é uma doença arboviral endêmica em vários países tropicais. Embora muitos esforços têm sido feitos para a produção de vacinas imunogênicas mais eficientes para os quatro sorotipos virais, alta taxa de erro durante a replicação do genoma de RNA viral possibilita uma maior resistência a terapias virais. Devido a falta de terapias e vacinas eficazes este estudo desenvolveu um mecanismo de degradação específica contra proteínas do vírus da dengue. Os resultados mostraram que o sistema diminuiu significativamente a produção da proteína E do envelope viral e a molécula de NS1, inibindo, assim, aproximadamente 90% da replicação viral após 24 e 72 horas de infecção com o vírus da dengue tipo 1. Além disso, o mecanismo também mostrou-se eficiente para o combate do vírus da dengue tipo 2. Este sistema pode ser uma alternativa para a terapia da dengue ou na construção de vetores incapazes de transmitir o vírus.

**Introdução:**

O vírus da dengue (DENV) é um vírus de RNA de fita positiva envelopado cujo genoma possui aproximadamente 11kb (29). Membro da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus*, apresenta tradicionalmente 4 sorotipos bem estudados e um novo recentemente descoberto circulante entre os macacos da Malásia (11, 22). Considerada como um problema de saúde pública, os sintomas da dengue podem variar de uma simples febre a um severo extravasamento vascular, levando a síndrome do choque com risco de vida (DFH/DSS) (2, 3).

O ciclo de vida do vírus da dengue começa com a ligação do vírus aos receptores específicos, mediado pela proteína envelope. Após a ligação, ocorre a endocitose com formação de vesículas ácidas, a qual proporcionará o processo de fusão entre o capsídeo e a membrana da vesícula. O RNA liberado sintetiza as proteínas virais no interior do retículo e em poucas horas após a infecção, dezenas de milhares de cópias de moléculas virais são produzidas a partir de uma única molécula viral, o que leva a lesão celular e, em casos graves, à morte (31).

Embora esforços têm sido feitos em buscas de terapias adequada pelos pesquisadores, a falta de modelo animal e a necessidade de uma vacina altamente imunogênica contra os quatro sorotipos têm dificultado a implantação de terapias adequadas contra a doença (7, 12). Além disso, as altas taxas de erro decorrente da replicação do genoma viral e a possibilidade de utilizar fatores da célula hospedeira para a replicação e tradução das proteínas virais, proporciona ao vírus a capacidade de aumentar a resistência contra as respostas imunológicas e contra as vacinas virais (10, 25). A necessidade de desenvolver terapias antivirais de baixo custo e de alta eficiência têm mobilizado pesquisas de toda parte do mundo em função de diminuir a doença.

Várias plataformas vem sendo aplicadas como terapia antiviral, como por exemplo vacinas de DNA (6), RNAi (12), terapia com anticorpos neutralizantes (23, 30) e vacina através da produção de proteínas recombinantes (18, 21).

Em nosso estudo desenvolvemos um mecanismo de inibição viral via degradação específica contra as proteínas do vírus no interior do retículo endoplasmático, por um mecanismo semelhante ao controle de qualidade da célula. Neste trabalho, fusionamos a SEL1L recombinante (28) tanto ao scFv previamente selecionado por *Phage Display* alvo-específico quanto a um receptor viral (prohibitina) (15) com intuito de promover a diminuição de proteínas específicas do vírus.

A SEL1L é uma proteína transmembrânica, membro do complexo de ligase de ubiquitina HRD1, o qual está envolvido na degradação das proteínas mal-enoveladas do retículo endoplasmático (ERAD) (20).

O acúmulo de grandes quantidades de proteína, o mal-enovelamento ou falhas na finalização de formação de complexo multiproteíco promovem a formação de agregados tóxicos ativando a Resposta a proteína mal-enovelada (*Unfolded Protein Response* - UPR) e a Degradação de proteínas mal-enoveladas associada ao retículo endoplasmático (ERAD) (27).

A UPR aumenta a transcrição de chaperonas envolvidas na via ERAD para auxiliar na eliminação dos excesso de proteínas no interior da célula(8). Enquanto que na ERAD, o complexo HRD1-SEL1L, juntamente com as proteínas OS-9/XTP3-B, reconhecem os domínios proteicos mal-enovelados de membrana ou luminal no interior do RE (5). A SEL1L associada a proteína alvo do ERAD, ao interagir com a molécula de Derlin 1, uma provável proteína do canal de retro-translocação (14), promove o deslocamento e ubiquitinação pelo lado citosólico do retículo endoplasmático, assegurando a eficiente entrega para o proteasoma (24).

Ao substituirmos, o domínio de reconhecimento de proteínas mal-enovelamentas da SEL1-L por um scFv ou receptor específico para as proteínas do vírus da dengue aumentamos a possibilidade de degradar proteínas virais e de inibir a formação de novas partículas, tornando este sistema uma ferramenta poderosa contra o vírus da dengue.

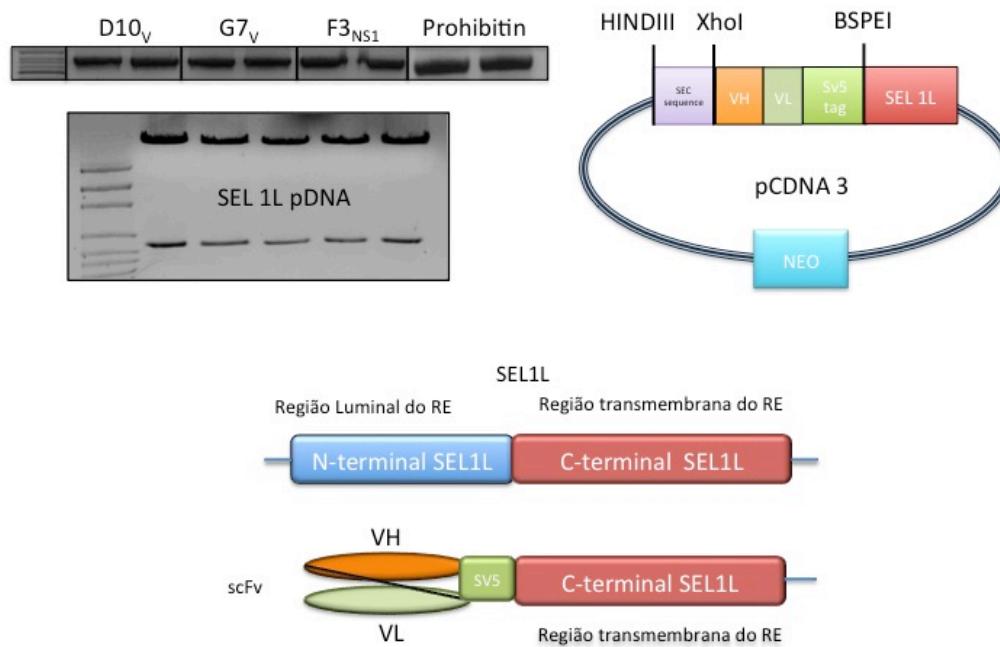
## **Resultados:**

### **Construção do sistema de degradação viral:**

Para a construção do sistema de degradação do vírus da dengue via proteasoma, foram escolhidos 2 clones (scFv-D10<sub>V</sub> e scFv-G7<sub>V</sub>) que expressam fragmentos de anticorpos (scFv) selecionados previamente (capítulo II) contra a partícula viral e 1 clone de scFv-F3<sub>NS1</sub>, contra a molécula de NS1, todos selecionados previamente por *Phage Display* (capítulo II). Os fagomídeos desses clones foram reamplificados, utilizando primers específicos contendo sítios de restrição para região codificantes (CDS) do scFv para garantir a

clonagem no vetor de expressão pcDNA 3, o qual continha o fragmento do gene codificador da molécula de SEL1L previamente clonado(28).

Um receptor viral predito no genoma de *Aedes aegypti*, denominado de prohibitina, foi amplificado a partir de cDNA de células C6/36 e clonado no vetor de expressão contendo fragmento do gene codificador da SEL1L que expressa os primeiros 401 aminoácidos (28) dessa proteína, preservando as regiões que interagem com as proteínas envolvidas no ERAD, tal como, HRD1, OS9, XTP3-B, p-97 ATPase, Derlin-1 (5, 28). Todos os amplicons tiveram tamanho próximos de 800pb (figura 1).



**Figura 1- Construção do sistema de degradação viral através da fusão de scFv ou receptor viral de inseto com o fragmento da SEL1L.**

Os scFv selecionados e o receptor viral prohibitina foram clonados para serem expressos fusionado na região N-terminal do fragmento da SEL1L, Após a subclonagem, as células Vero foram transfetadas com vetor de expressão e os clones celulares foram selecionados com o antibiótico de seleção geneticina

(G418). Para as construções, scFv-D10<sub>V</sub>, scFv-G7<sub>V</sub>, e prohibitina<sub>PH</sub> foram selecionados 4 clones celulares para cada construto que foram denominados A2N-D10<sub>V</sub>, A3N-D10<sub>V</sub>, B2-D10<sub>V</sub>, B5-D10<sub>V</sub>, A2N-G7<sub>V</sub>, C5-G7<sub>V</sub>, D2-G7<sub>V</sub>, D3-G7<sub>V</sub>, A3<sub>PH</sub>, A6<sub>PH</sub>, B1<sub>PH</sub>, B2<sub>PH</sub>, respectivamente. Para o scFv-F3<sub>NS1</sub> foram selecionados 3 clones celulares denominados C1- F3<sub>NS1</sub>, C2- F3<sub>NS1</sub>, C3- F3<sub>NS1</sub>.

#### Análise da expressão do sistema de degradação viral:

As proteínas dos clones celulares, após a seleção, foram extraídas e analisadas tanto por ELISA (Fig. 2) quanto por *Western blot* (Fig.3). Todos os clones selecionados foram capazes de expressar o scFv ou o receptor prohibitina fusionada à SEL1L. Os clones referentes as scFv reagiram tanto para o anticorpo anti-HIS tag quanto para o anticorpo anti-SV5 tag quando testados. Os clones referentes a prohibitina e ao scFv irrelevante apresentaram resultados positivos para expressão após a análise com anticorpo anti-SV5 tag .

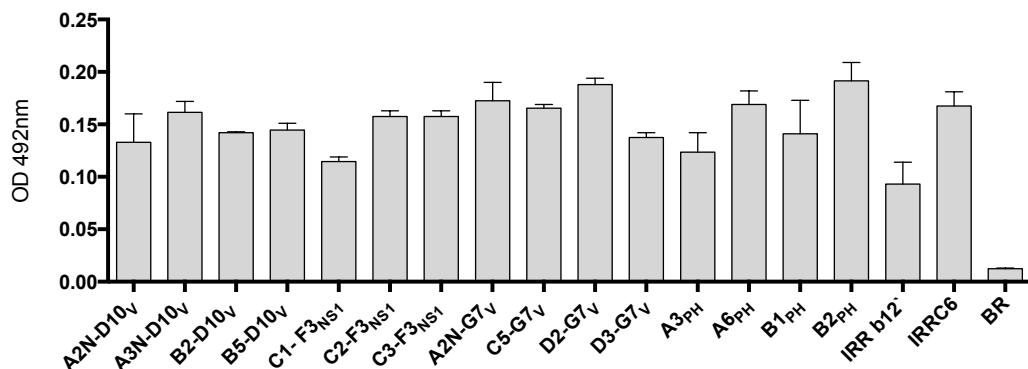


Figura 2- Reatividade dos clone que expressam o sistema de degradação. Reatividade de triplicada das células contra o anticorpo sv5-tag. A barra superior mostra a media e desvio padrão da OD492nm de triplicata de amostra independente.

A análise do *Western blot*, também, demonstrou que as células são capazes de expressar o sistema de degradação viral tanto para o scFv clonado como para o receptor viral prohibitina, apresentando uma banda cuja massa é de aproximadamente 70KDa.

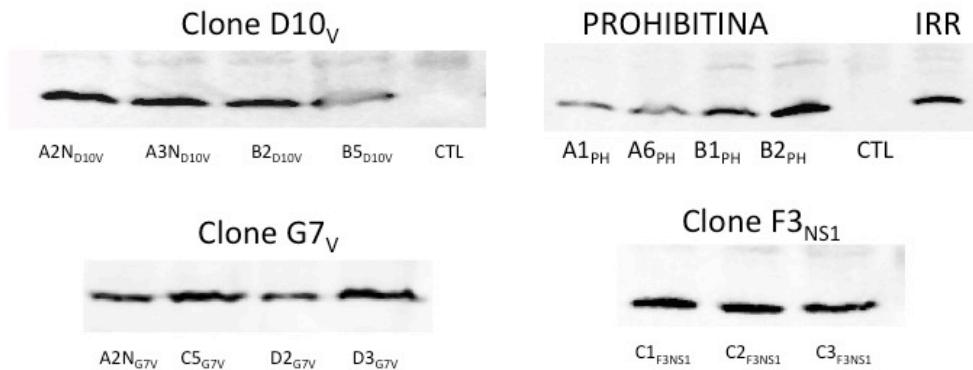


Figura 3- Expressão da degradina na células Vero em diferentes clones celulares. Ensaio de *Western blot* usando anticorpo monoclonal anti-SV5tag.

#### Análise da inibição da replicação viral em 1 e 3 dias

A atividade da inibição viral foi verificada pelo ensaio de qPCR, após 1 hora de infecção e 24 e 72 horas de proliferação do vírus da dengue tipo 1, nas células que expressam o anticorpo ou o receptor viral associados à degradina, nas células que expressam um anticorpo irrelevante (controle negativo) e nas células sem transfeção (controle negativo). O RNA do sobrenadante da cultura foi extraído e o cDNA viral foi quantificado.

Todos os clones que expressaram os fragmentos de anticorpos ou a prohibitina recombinante fusionados na SEL1L foram capazes de inibir aproximadamente 90% (tabela-1) da replicação viral após 24 horas de infecção. Contudo, após o terceiro dia, somente os clones de scFv G7<sub>V</sub> e o receptor de prohibitina conseguiram manter o maior nível significativo de degradação viral. O scFv D10<sub>V</sub> não apresentou nenhum clone celular que resultou em uma diferença estatística após três dias, ao passo que o scFv F3<sub>NS1</sub> apresentou diferenças significativas somente com a célula controle (Fig. 4).

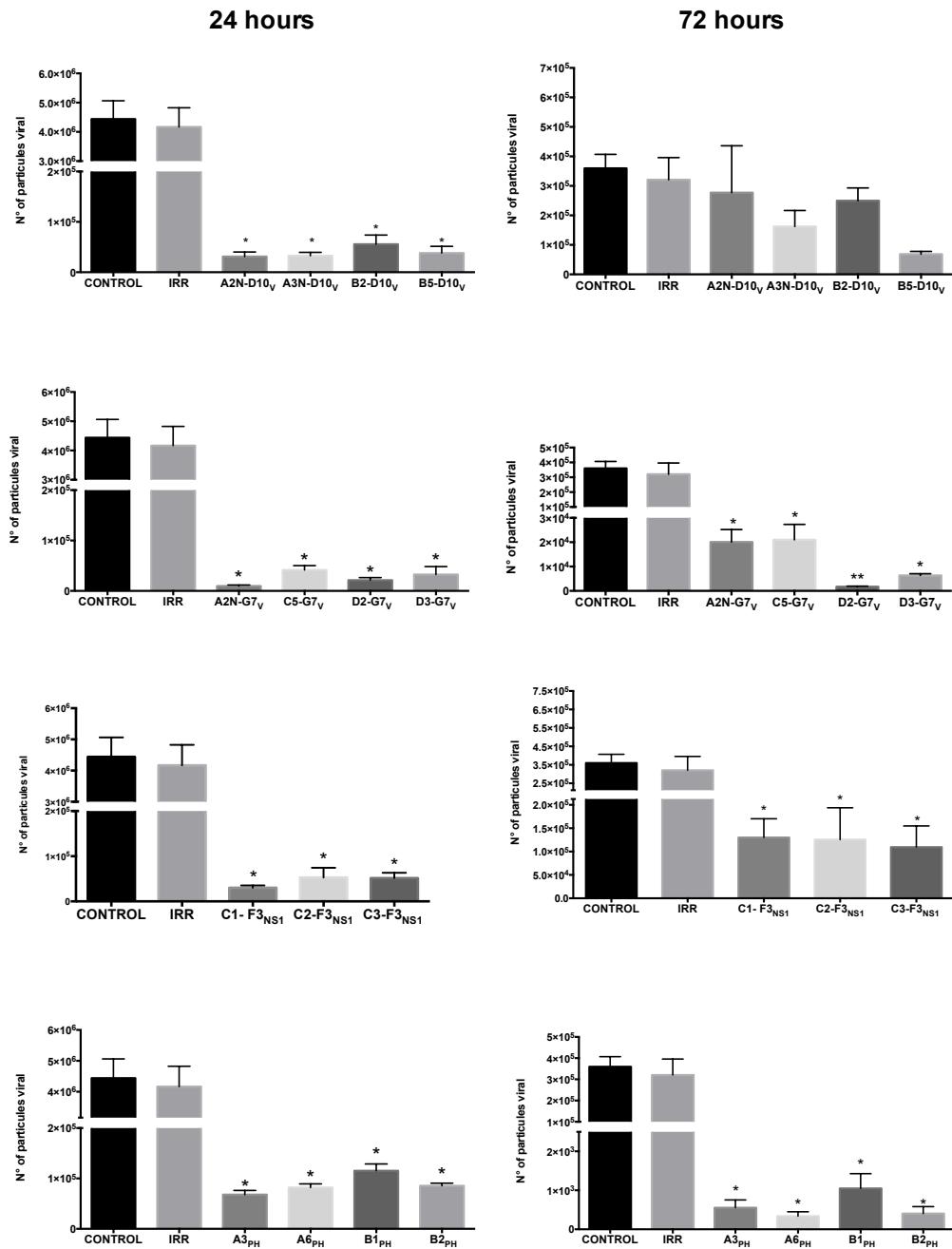


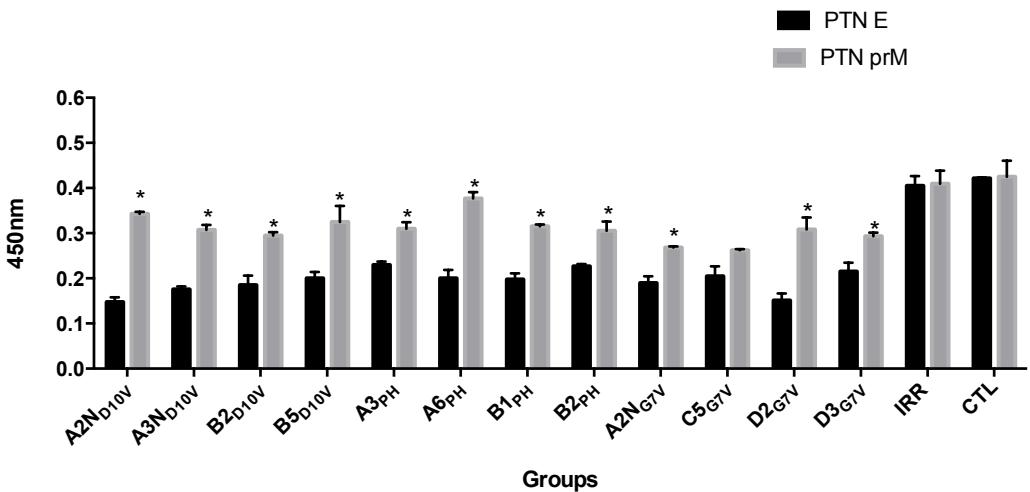
Figura 4 – Inibição da replicação viral promovida por diferentes sistemas degradinas. As partículas virais foram quantificadas por qPCR após 24 e 72 horas. O símbolo \* representa os clones que obtiveram diferença significativa ( $p < 0.001$ ) no teste de ANOVA, com o pós teste Bonferroni. Estatística realizada pelo programa GraphPad Prism 6.0. A barra superior mostra a média e desvio padrão da OD492nm de triplicata de amostra independente.

**Tabela 1: Media e porcentagem de inibição da quantidade viral da triplicata do experimento de qPCR.**

	24 hours	mean	inhibition (%)	72 hours	mean	inhibition (%)
CONTROL	4440000		0.00	CONTROL	359617	0.00
IRR	4167000		6.15	IRR	320566	10.86
A2N-D10 <sub>V</sub>	31113		99.30	A2N-D10 <sub>V</sub>	277026	22.97
A3N-D10 <sub>V</sub>	32668		99.26	A3N-D10 <sub>V</sub>	162260	54.88
B2-D10 <sub>V</sub>	55657		98.75	B2-D10 <sub>V</sub>	249576	30.60
B5-D10 <sub>V</sub>	38057		99.14	B5-D10 <sub>V</sub>	68566	80.93
A2N-G7 <sub>V</sub>	9542		99.79	A2N-G7 <sub>V</sub>	20056	94.42
C5-G7 <sub>V</sub>	41600		99.06	C5-G7 <sub>V</sub>	20992	94.16
D2-G7 <sub>V</sub>	21288		99.52	D2-G7 <sub>V</sub>	1682	99.53
D3-G7 <sub>V</sub>	32585		99.27	D3-G7 <sub>V</sub>	6339	98.24
C1- F3 <sub>NS1</sub>	30100		99.32	C1- F3 <sub>NS1</sub>	130189	63.80
C2-F3 <sub>NS1</sub>	52917		98.81	C2-F3 <sub>NS1</sub>	125608	65.07
C3-F3 <sub>NS1</sub>	51515		98.84	C3-F3 <sub>NS1</sub>	109519	69.55
A3 <sub>PH</sub>	67983		98.47	A3 <sub>PH</sub>	554.2	99.85
A6 <sub>PH</sub>	82000		98.15	A6 <sub>PH</sub>	336.6	99.91
B1 <sub>PH</sub>	115350		97.40	B1 <sub>PH</sub>	1047	99.71
B2 <sub>PH</sub>	85350		98.08	B2 <sub>PH</sub>	404.2	99.89

Uma vez que a seleção do anticorpo foi feito na partícula viral, precisava-se qualificar qual era a possível proteína do envelope que estava sendo degradada pelos sistema das *degradinas*. Por isso as proteínas das células, cujo foi feito a quantificação do número das partículas virais, foram submetidas ao ensaio de ELISA com anticorpos anti- proteína prM e proteína E.

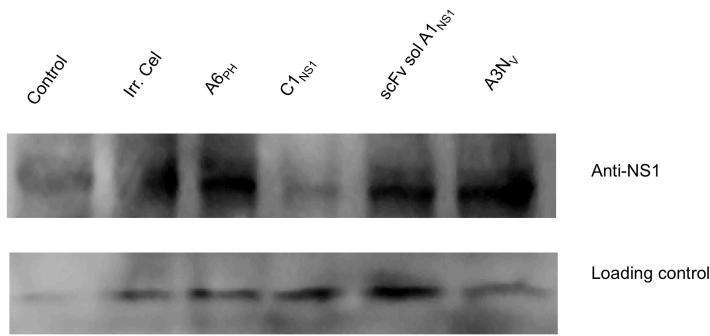
Ao comparar as reatividades dos clones contra a proteína prM e contra a proteína E, verificou-se que houve uma redução significativa da reatividade com o anticorpo contra a proteína E comparado a proteína M em todos os clones analisados quando ao clone celular que expressa a *degradina* irrelevante e célula controle. A redução da reatividade da proteína prM também foi evidenciado no experimento.



**Figura 5- Reatividade da proteína E e proteína M presente nos clones que expressão o sistema de degradação viral.** ). O símbolo \* representa os clones que obtiveram diferença significativa ( $p<0.001$ ) no teste de ANOVA two way, com o pós teste Bonferroni. Estatística realizado pelo programa GraphPad Prism 6.0. A barra superior mostra a media e desvio padrão da OD492nm de triplicata de amostra independente.

A degradação específica da molécula NS1 também foi analisada por *Western blotting*. Células controle, clone que expressa *degradina* irrelevante, bem como clones que interagem com a superfície viral foram testado juntamente com o clone que expressa scFv- *degradina* específico contra a molécula NS1.

O resultado de *Western blotting*, apresentado pela figura 6, revelou que uma diminuição da intensidade da banda específica de NS1 (40KDa) para o clone C1<sub>NS1</sub> quando comparadas aos outros clones, demonstrando a eficiência do sistema *degradina*.



**Figura 6- Degradação da molécula alvo pelo clone C1<sub>NS1</sub>.** Western blot do extrato proteico das células infectadas com vírus da dengue 1 após 24 de cultivo. A marcação utilizando anticorpo anti actina foi utilizada para normalizar a quantidade de proteína.

#### Teste da inibição com o vírus da dengue tipo 2.

Com o intuito de analisar se o sistema de degradação viral é capaz de inibir outras variantes virais, um clone celular para cada scFv-degradina e um clone para prohibitina-degradina foram incubados com o vírus tipo 2 por 1 hora e o sobrenadante foi analisado após 24 horas.

Assim como verificado para o vírus da dengue tipo 1, após 24 horas de infecção, todos os clones foram capazes de inibir significativamente ( $p<0.01$ ) a replicação viral do sorotipo 2 também, sendo que o clone D10<sub>v</sub> foi mais eficiente, apresentando uma inibição maior de 95%.

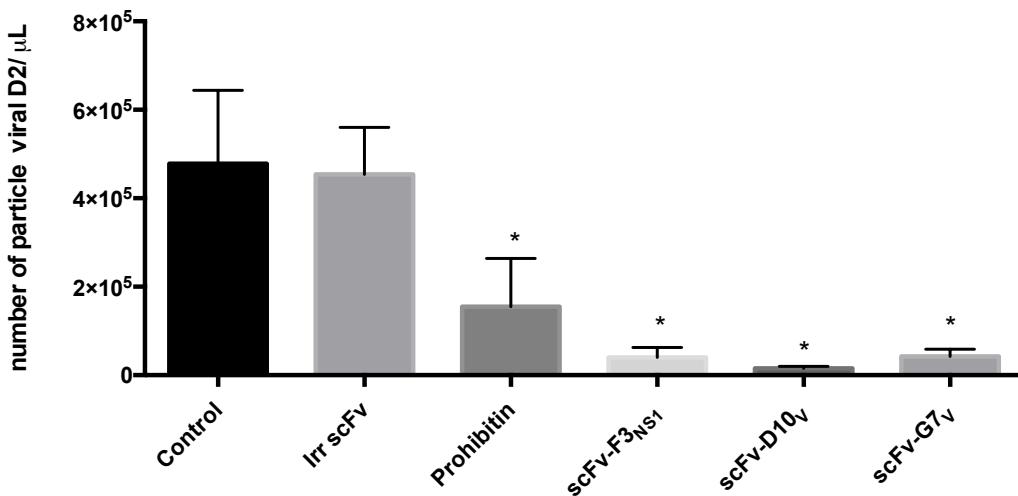


Figura 7- Inibição da replicação do vírus dengue 2 pelos sistemas de degradina. As partículas virais foram quantificadas por qPCR após 24 horas de infecção. O símbolo \* representa os clones que obtiveram diferença significativa ( $p<0.001$ ) no teste de ANOVA, com o pós teste Bonferroni. Estatística realizado pelo programa GraphPad Prism 6.0. A barra superior mostra a media e desvio padrão da OD492nm de triplicata de amostra independente

Tabela 2- Média e porcentagem de inibição da quantidade viral da triplicata do experimento de qPCR.

	Control	Irr scFv	Prohibitin	scFv-F3NS1	scFv-D10v	scFv-G7v
Mean	4.78E+05	4.54E+05	1.55E+05	4.05E+04	1.53E+04	4.24E+04
inhibition (%)	0.00	5.07	67.57	91.54	96.81	91.13

## Discussão

Neste trabalho demonstramos a efetividade do sistema *degradina* em interferir na replicação do vírus da dengue tipo 1 e tipo 2 após 24 horas de infecção. A inibição foi feita através da eliminação da proteína NS1 e provavelmente da proteína do envelope viral via SEL1L-proteasoma (28).

SEL1L é uma molécula do interior do retículo homóloga a Hrd3p da levedura que possui uma importante função no reconhecimento das proteínas mal-enoveladas e no recrutamento desses substratos para o sítio de retro-translocação para a degradação via proteasoma (5).

No trabalho de Vecchi et al, 2012 (28), a autora construiu uma versão

recombinante da SEL1L, denominado *degradina*, que consistia de uma porção N-terminal apresentando scFv anti-receptor de IgE e um domínio C-terminal derivado dos 402 aminoácido finais da molécula SEL1L. Neste trabalho a autora verificou que a fusão de um ligante de uma molécula alvo ao fragmento final da SEL1L permite a degradação específicas das moléculas.

Em nosso trabalho fusionamos à SEL1L fragmentos de anticorpos previamente selecionados por *Phage Display* (capítulo II) e bem como uma proteína de inseto que reconhece o envelope viral, a prohibitina, para analisar os efeitos gerados quanto a produção de partículas virais. Em nossa construção do sistema de degradação, utilizamos dois clones que apresentam sequências de scFv diferentes e com capacidade de interagir com proteínas do envelope viral e um clone apresentando scFv contra a molécula NS1. Além disso, clonou-se um fragmento de aproximadamente 800pb que codifica uma proteína predita descrita como receptor do vírus da dengue tipo 2 no genoma de *Aedes*, a prohibitina (15).

A efetividade da ação das *degradinas* construídas nesse trabalho foi verificada pelo teste de inibição da replicação viral. A diminuição das proteínas do envelope, especificamente a E e M, realizada pelos sistemas de scFv-*degradina* (clone D10V e G7V e o receptor prohibitina) provavelmente interferiu na produção de novas partículas virais. O reconhecimento da proteína E e a sua degradação intermediada pela *degradina*, pode ter inibido a formação do envelope e portanto torna a montagem partícula viral defectiva. A proteína E é importantes para montagem, ligação ao receptor, a entrada, fusão viral, e, possivelmente, evasão do sistema imune durante o ciclo de vida dos *Flavivirus* (1).

A diminuição da proteína prM, também verificada neste trabalho, pode ter sido promovida pelo mesmo sistema degradina (isolado contra partícula viral inteira). A redução dessa molécula pode ter sido ocasionada pela degradação do polipeptídio inteiro, ou do peptídeo E ainda fusionado ao prM. A degradação da proteína poderia ocorrer da mesma maneira que o mecanismo de ERAD-M, em que o reconhecimento dos domínios mal enovelados ocorre em proteínas

presentes na membrana do retículo endoplasmático reconhecido também pelo complexo HRD1 (13, 28).

A outra explicação para a diminuição dos níveis dessas proteínas, poderia ser a redução do número de partículas virais que re-infectam as células o que levaria consequentemente a diminuição da produção de proteínas virais.

A ação prolongada do sistema de degradação foi verificada após 72 horas pós-infecção. Embora dois clones ( $D10v$  e  $F3_{NS1}$ ) de scFv-degradina não apresentaram o mesmo sucesso quando comparado ao tempo de 24 horas, os clones de degradina  $G7v$  e da prohibitina mantiveram uma degradação superior a 90%, o que demonstra a eficiência no controle da replicação viral pela célula.

A especificidade da degradação do sistema viral pode ser verificada no ensaio de *Western Blotting*. A diminuição da intensidade da banda da NS1 presente no clone  $C1_{NS1}$ , juntamente com a inibição de replicação viral medida por qPCR mostram a exatidão da ação terapêutica na eliminação da proteína importante para a replicação do vírus.

Estudos têm mostrado que a principal função da NS1 intracelular é a regulação da síntese da fita negativa do RNA viral (17). Além disso, esta molécula pode interagir com múltiplas proteínas do hospedeiro e com proteínas virais NS4A e NS4B (16, 19, 26), integrando vias essenciais ou fornecer componentes necessários que facilitam a replicação do RNA no citoplasma. A supressão de NS1, portanto, impede a replicação (17, 32), como foi observado em nossos ensaios de degradação específica de NS1 por *degradinas*.

O sistema de degradação foi também testado com o vírus da dengue tipo 2. A similaridade de estruturais e na sequência no envelope viral ou nas proteínas não estruturais entre os *Flavivirus* (4, 33) poderia facilitar o reconhecimento de epitópos semelhante entre dengue 1 e dengue 2 pelo anticorpo, facilitando a degradação da proteína alvo e inibindo a replicação de outros sorotipos. Além disso, a prohibitina-degradina, descrita como receptor presente na células de inseto para dengue tipo 2, a qual funcionou também para o sorotipo 1, demonstra a capacidade de receptores ou anticorpos se ligarem a diferentes sorotipos virais.

Assim, por haver a falta de tratamento contra a dengue, existe uma forte necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas (12). A ação efetiva do sistema da *degradina* em mais de um tipo de vírus demonstra a sua possível ação terapêutica contra dengue. O sistema de degradação poderia ser entregue por meio de adenovírus recombinantes não capazes de gerar uma resposta imune inflamatória mas capazes, mas que em virtude da expressão das *degradinas*, poderia conferir as células resistência contra o vírus da Dengue (34). O sistema de degradação apresentado nessa tese poderia ser utilizado, também, na imuno-terapia ex Vivo, em que células dendríticas ou PBMC que expressam a *degradina* contra a dengue são re-injetadas no indivíduo a fim de conferir resistência viral. Além disso o sistema de degradação poderia ser utilizado para a produção de insetos-vetores transgênicos com intuito de inibir o vírus no interior do mosquito e inibir assim a dispersão do vírus no meio ambiente. Dessa forma, a inibição do vírus da dengue tipo 1 e 2 através do sistema scFv-*degradina* poderia se tornar uma importante ferramenta para o combate ao vírus.

## **Material e Métodos:**

### **10. Construção de sistemas de *degradinas* (scFv e prohibitina fusionada com SeL1L 1) expresso em células Vero.**

Para a construção do sistema de degradação, foi utilizado os seguintes primers e o oligonucleotídeos (SEC sequence):

Tabela 3 - Primers foward e reverso para a amplificação de scFv

Sistema de scFv -degradina	
Forward (enzima de restrição Xhol)	5'- atgt <u>ctcgag</u> GGTTTCGCTACGTGGCCAG -3'
Reverso (enzima de restrição BSPEI)	5'- atgt <u>tccgga</u> CTAATGGTGATGGTATGGTCTGGCC -3'

Tabela 4 - Primers foward e reverso para a amplificação do fragmento de prohibitina

Sistema de prohibitina-degradina	
Forward (enzima de restrição Xhol)	5`-atgc <u>ctcgag</u> TACGGTATCAACAATTCCATG-3`
Reverso (enzima de restrição BSPEI)	5`-atg <u>ctccgga</u> CTTATTGAAACTTCTTGGAC-3`

Tabela 5 – Sequência de nucleotídeos do peptídeo sinalSec sequence

SEC sequence com fragment de KOZAC	
Oligo forward (5`- HindIII e 3`-Xhol)	5'- AGCTTcacaATGGGCTGGAGCCTGATCCTCCTGTTCTCG TCGCTGTGGCTACAGGTc-3'
Oligo reverso (5`- Xhol e 3`- HindIII)	5'- tcgagACCTGTAGCCACAGCGACCGAGGAACAGGAGGATCA GGCTCCAGCCCCATtgtgA-3

Para amplificação das sequências de scFv contidas no vetor pComb 3XSS foram utilizados primers da tabela 1. Para a amplificação da prohibitina, três mosquitos *Aedes aegypti* foram coletados e macerados em Trizol para o isolamento de RNA, conforme a instrução do fabricante. A partir do RNA isolado realizou-se a RT-PCR porém utilizando o primer reverso da tabela 2. Posteriormente, realizou-se a PCR para amplificação do fragmento do gene que

codifica a proteína prohibitina com o conjunto dos primers da tabela 2. As sequências para scFv e prohibitina amplificadas foram analisadas em por eletroforese em gel de agarose 1% e purificadas pelo kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen- 28706).

Em seguida, as sequências foram clonadas no vetor *pGem-t easy* (Promega) conforme o manual do fabricante e transformado na bactéria DH-10B eletrocompetente, plaqueados em meio LB ágar contendo ampicilina (10µg/mL) como antibiótico de seleção e as colônias foram crescidas em meio LB contendo o mesmo antibiótico para a amplificação dos insertos. Foi feito a extração do plasmídeo com o kit Miniprep (Qiagen) e quantificado pelo espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop). O inserto foi digerido utilizando as enzimas Xhol (New England -) e BSPEI (New England ). Realizou-se, também, o anelamento dos oligonucleotídeos em tampão de anelamento (10 mM Tris, pH 7.5–8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA). Neste procedimento, misturou-se 150mM do oligo forward e 150mM do oligo reverso no tampão em um tubo de 0.6mL no volume final de 100µL e em seguida, aqueceu a solução até a temperatura de 95°C por 5 minutos, e deixou o tubo a chegar a temperatura ambiente. Posteriormente, 100pmol da solução de oligo foi fosforilado utilizando a enzima T4 polinucleotide kinase (Promega), conforme a reação abaixo, a temperatura de 37°C por 1 hora.

Para a clonagem utilizou-se o vetor pcDNA3-scFv9E1-SV5-SEL1L (Vecchi, 2012). O vetor foi digerido com HindIII (New England - R0104T) e BSPEI (New England), para a clonagem do scFv fusionada a *degradina*. Foi feita ligação tripla

entre os oligos de peptídeo sinal, os insertos de scFv e o vetor, durante 16 h a 4°C.

O plasmídeo foi transformado em bactéria DH10-B eletro-competente e plaqueado em meio LB ágar contendo ampicilina como antibiótico de seleção. Em seguida, colônias de bactérias foram crescidas em meio LB líquido contendo ampicilina (10µg/mL) durante 16 horas e feito a extração do plasmídeo com o kit Miniprep da Qiagen (Qiagen-27106) e quantificado pelo espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop).

## **11. Linhagens celulares e transfecção**

As células das linhagens C6/36 (*Aedes albopictus*) e Vero foram gentilmente cedidas pelo professor Jonny Yokasawa do laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia. As células C6/36 foram cultivadas em meio Leibowitz 15 (L-15) (Gibco- 11415-056) suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco-10082-139), triptose fosfato (Invitrogen-T8782), aminoácidos essenciais (Invitrogen- 11130-051), gentamicina (Invitrogen- 15750-078). As células foram mantidas a 28°C. A linhagem Vero (ATCC CRL-1651) foi cultivada em meio DMEM (Gibco- 11965-118) suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco-10082-139), e gentamicina (Invitrogen- 15750-078). As linhagens foram utilizadas para o cultivos de vírus e para as clonagens do sistema de degradação do vírus da dengue.

As células Vero foram plaqueadas com  $2 \times 10^5$  célula por poço em placa de 24 poços contendo DMEM 10% de SFB durante 16 horas. Para as soluções de transfecção, 500ng do plasmídeo contendo o o vetor de expressão do scFv

solúvel foi diluído em 50µL meio DMEM incompleto e posteriormente em outra solução contendo 2µL de lipofectamina 2000 (Invitrogen- 11668-027) 50µL DMEM incompleto. Ambas as soluções foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. As células plaqueadas foram lavadas 1 vez com PBS 1X e adicionou-se a solução de DNA, lipofectamina nos poços. As células foram incubadas com a solução por 16 horas, e em seguida, lavadas com PBS 1X. Acrecentou-se meio DMEM completo com 0,9µg/ml de geneticina (G-418) (Invitrogen- 10131027) por poço para a seleção de clones de células transfectadas.

Após 14 dias os clones de células foram isoladas com papel de filtro *Whatman* cortado e tripsina, e colocados em placas de 96 poços contendo meio DMEM completo acrescido de 0,9µg/ml deG-418.

Os clones que expandiram foram tripsinizados e repassados para uma placa de 24 poços e, em seguida, iniciou-se os testes para verificar a expressão das proteínas do sistema de degradação.

## **12.Verificação da expressão do sistema de degradação por Western Blotting**

A cultura de células Vero transformadas e selecionadas cultivadas em meio DMEM complete contendo geneticina foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. O pellet de células foram lavadas com PBS 1X e novamente centrifugadas na condição anterior. As proteínas totais da células foram extraídas no tampão TNT (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 0.5% Triton-X) suplementas com um coquetel de inibidor de protease (Roche) e congeladas

em -80°C. Foram fervidas 20 µL das proteínas extraídas das células em tampão de amostra (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,5% SDS, 10% glicerol, 0,002% de bromo azul de fenol e 0.7135M β-mercaptoethanol), corridas no Gel SDS PAGE 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose por meio de tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 10% methanol), por 2 horas a temperatura ambiente.

Após transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com PBS 1X suplementada com 3% de leite desnatado em pó por 1 hora a TA. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com PBST 0,05% de *Tween*, e incubada com o anticorpo primário anti-His ou anti-SV5tag na proporção de 1:2500 por 3 hora A TA. Repetiu-se as 3 lavagens com PBS-T 0,05% e incubou a membrana com anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase por 1hora a TA. Lavou-se as membranas com PBS-T 0,05% 3 vezes e o western foi revelado com o sistema de ECL, e a imagem foi capturada pelo sistema InVIVO FX da KODAK

### **13. Extração de RNA viral e Produção de cDNA viral**

As células C6/36 (*Aedes albopictus*) foram infectadas com os vírus da dengue tipo 1 e tipo 2 seguida pela extração do RNA viral feito com Trizol seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen- 15596-018).

Para o designer dos primers utilizou-se os acessos do NCBI n° AAD11533.1 e n° ADW16025.1. Foram utilizados os primers 5' –GAACATTCGGAAAGCTT-3' (forward) e 5' –CTCGCGCGTTTCAGCATATTGA-3' (reverse). O RNA viral foi submetido a transcrição reversa (RT-PCR) (Invitrogen- 28025-021) nas

condições recomendadas pelo Fabricante.

### **13.1. Construção da Curva de quantificação viral e Clonagem**

Para a construção da curva de quantificação viral o primers utilizados foram 5`-GAACAGTTCGAATCGGAAGCTT-3` (forward) e 5`-CTCGCGCGTTTCAGCATATTGA-3` (reverse). Os fragmentos amplificados pela PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente tiveram as bandas foram cortadas e purificados utilizando kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen- 28706). Os fragmentos foram clonados no vetor pGEM *t*-easy (Promega). O plasmídeo foi inserido em *E. coli* DH10-B e plaqueado em meio LB ágar contendo ampicilina (10µg/mL) (Invitrogen) como antibiótico de seleção. O plasmídeo foi purificado utilizando o kit Miniprep (Qiagen) e quantificado em Nadodrop ND-1000 (NanoDrop).

Para confirmar a inserção do fragmento no plasmídeo, foi realizado uma PCR seguida pelo seu sequenciamento. O plasmídeo foi digerido pela enzima de restrição EcoRI (New England - R0101S) para certifica-se do inserto clonado. Para o cálculo do número de cópias utilizou-se a equação abaixo segundo Godornes et al, 2007(9).

$$\text{Cópias}/\mu\text{L} = \frac{6.02 \times 10^{13} \text{ cópias} \times \text{a concentração do plasmídeo g}/\mu\text{L}}{\text{Número de bases} \times 660 \text{ daltons}}$$

#### **14. Validação do sistema por PCR em Tempo Real**

Após a certificação da produção do scFv-degradina e prohibitina-degradina as células em triplicata foram testadas para certificar a funcionalidade de inibir a replicação do vírus.

Para este teste os clones foram plaqueados em triplicata com  $2 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços por 16 horas em estufa de cultura celular. Os clones com plasmídeo contendo scFv irrelevante e as células vero não transfectadas foram utilizadas como controle do sistema.

As células foram incubadas com o vírus da dengue na  $1,92 \times 10^{11}$  partículas virais por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  sob gentil agitação. Posteriormente, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X, e adicionado 250  $\mu\text{L}$  de meio DMEN completo com 3% SFB sem o antibiótico. A produção de novas partículas virais foi verificada após 24 horas e 72 horas.

Para análise de produção de novas partículas virais, extraiu-se o RNA dos 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante dos poços com TRizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, e em seguida realizou-se a RT-PCR de acordo com o protocolo descrito no item de construção da curva do Tempo Real. E

As amostras foram analisadas em Syber Green (Life Technologies) em duplicata no aparelho de tempo 7500 Real Time PCR System (Applied System). A temperatura de anelamento e extensão foi de  $56^\circ\text{C}$  em 40 ciclos.

## **15. Análise estatística**

Para as análises estatísticas foram utilizadas o programa GraphPad Prism 6.

Para analisar a diferença das medias entre os grupos foi utilizado a ferramenta de variância de multiplo teste-t com pós teste Holm- Sidak, ANOVA com pós-teste Bonferroni.

## **Referências:**

1. **Arjona, A., M. Ledizet, K. Anthony, N. Bonafe, Y. Modis, T. Town, and E. Fikrig.** 2007. West Nile virus envelope protein inhibits dsRNA-induced innate immune responses. *J Immunol* **179**:8403-9.
2. **Chambers, T. J., Y. Liang, D. A. Droll, J. J. Schlesinger, A. D. Davidson, P. J. Wright, and X. Jiang.** 2003. Yellow fever virus/dengue-2 virus and yellow fever virus/dengue-4 virus chimeras: biological characterization, immunogenicity, and protection against dengue encephalitis in the mouse model. *J Virol* **77**:3655-68.
3. **Chambers, T. J., and T. P. Monath.** 2003. Preface to the flaviviruses. *Adv Virus Res* **60**:ix-xi.
4. **Chen, Y., T. Maguire, R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. D. Esko, R. J. Linhardt, and R. M. Marks.** 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* **3**:866-71.
5. **Christianson, J. C., T. A. Shaler, R. E. Tyler, and R. R. Kopito.** 2008. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* **10**:272-82.
6. **De Paula, S. O., D. M. Lima, R. F. de Oliveira Franca, A. C. Gomes-Ruiz, and B. A. da Fonseca.** 2008. A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *Arch Virol* **153**:2215-23.
7. **del Angel, R. M., and J. Reyes-del Valle.** 2013. Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet. *PLoS Pathog* **9**:e1003551.
8. **Elgaard, L., and A. Helenius.** 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**:181-91.
9. **Godornes, C., B. T. Leader, B. J. Molini, A. Centurion-Lara, and S. A. Lukehart.** 2007. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine* **38**:1-7.
10. **Guabiraba, R., and B. Ryffel.** 2014. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology* **141**:143-56.
11. **Guzman, M. G., S. B. Halstead, H. Artsob, P. Buchy, J. Farrar, D. J. Gubler, E. Hunsperger, A. Kroeger, H. S. Margolis, E. Martinez, M. B. Nathan, J. L. Pelegrino, C. Simmons, S. Yoksan, and R. W. Peeling.** 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* **8**:S7-16.
12. **Idrees, S., U. A. Ashfaq, and S. Khalid.** 2013. RNAi: antiviral therapy against dengue virus. *Asian Pac J Trop Biomed* **3**:232-6.

13. **Iida, Y., T. Fujimori, K. Okawa, K. Nagata, I. Wada, and N. Hosokawa.** 2011. SEL1L protein critically determines the stability of the HRD1-SEL1L endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) complex to optimize the degradation kinetics of ERAD substrates. *J Biol Chem* **286**:16929-39.
14. **Katiyar, S., S. Joshi, and W. J. Lennarz.** 2005. The retrotranslocation protein Derlin-1 binds peptide:N-glycanase to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **16**:4584-94.
15. **Kuadkitkan, A., N. Wikan, C. Fongsaran, and D. R. Smith.** 2010. Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology* **406**:149-61.
16. **Lindenbach, B. D., and C. M. Rice.** 1999. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* **73**:4611-21.
17. **Lindenbach, B. D., and C. M. Rice.** 1997. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol* **71**:9608-17.
18. **Marcos, E., L. Gil, L. Lazo, A. Izquierdo, E. Brown, E. Suzarte, I. Valdes, A. Garcia, L. Mendez, M. G. Guzman, G. Guillen, and L. Hermida.** 2013. Purified and highly aggregated chimeric protein DIIIC-2 induces a functional immune response in mice against dengue 2 virus. *Arch Virol* **158**:225-30.
19. **Miller, S., S. Sparacio, and R. Bartenschlager.** 2006. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem* **281**:8854-63.
20. **Mueller, B., E. J. Klemm, E. Spooner, J. H. Claessen, and H. L. Ploegh.** 2008. SEL1L nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:12325-30.
21. **Nguyen, N. L., J. M. Kim, J. A. Park, S. M. Park, Y. S. Jang, M. S. Yang, and D. H. Kim.** 2013. Expression and purification of an immunogenic dengue virus epitope using a synthetic consensus sequence of envelope domain III and *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* **88**:235-42.
22. **Normile, D.** 2013. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science* **342**:415.
23. **Pitaksajjakul, P., S. Benjathummarak, C. Pipattanaboon, W. Wongwit, T. Okabayashi, M. Kuhara, R. Misaki, K. Fujiyama, and P. Ramasoota.** 2014. Antibody germline characterization of cross-neutralizing human IgGs against 4 serotypes of dengue virus. *Biochem Biophys Res Commun* **446**:475-80.
24. **Shimizu, Y., Y. Okuda-Shimizu, and L. M. Hendershot.** 2010. Ubiquitylation of an ERAD substrate occurs on multiple types of amino acids. *Mol Cell* **40**:917-26.
25. **Shirogane, Y., S. Watanabe, and Y. Yanagi.** 2013. Cooperation: another mechanism of viral evolution. *Trends Microbiol* **21**:320-4.
26. **Tajima, S., T. Takasaki, and I. Kurane.** 2011. Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by additional mutations in NS4B. *Arch Virol* **156**:63-9.
27. **Tsai, Y. C., and A. M. Weissman.** 2010. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer* **1**:764-778.
28. **Vecchi, L., G. Petris, M. Bestagno, and O. R. Burrone.** 2012. Selective targeting of proteins within secretory pathway for endoplasmic reticulum-associated degradation. *The Journal of biological chemistry* **287**:20007-15.
29. **Villordo, S. M., D. E. Alvarez, and A. V. Gamarnik.** 2010. A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication. *RNA* **16**:2325-35.

30. **Williams, K. L., S. Sukupolvi-Petty, M. Beltramello, S. Johnson, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, M. S. Diamond, and E. Harris.** 2013. Therapeutic efficacy of antibodies lacking Fc gamma receptor binding against lethal dengue virus infection is due to neutralizing potency and blocking of enhancing antibodies [corrected]. *PLoS Pathog* **9**:e1003157.
31. **Yacoub, S., J. Mongkolsapaya, and G. Screaton.** 2013. The pathogenesis of dengue. *Curr Opin Infect Dis* **26**:284-9.
32. **Youn, S., R. L. Ambrose, J. M. Mackenzie, and M. S. Diamond.** 2013. Non-structural protein-1 is required for West Nile virus replication complex formation and viral RNA synthesis. *Virol J* **10**:339.
33. **Yu, K., Z. Z. Sheng, B. Huang, X. Ma, Y. Li, X. Yuan, Z. Qin, D. Wang, S. Chakravarty, F. Li, M. Song, and H. Sun.** 2013. Structural, antigenic, and evolutionary characterizations of the envelope protein of newly emerging Duck Tembusu Virus. *PLoS One* **8**:e71319.
34. **Zhang, W., R. Singam, G. Hellermann, X. Kong, H. S. Juan, R. F. Lockey, S. J. Wu, K. Porter, and S. S. Mohapatra.** 2004. Attenuation of dengue virus infection by adeno-associated virus-mediated siRNA delivery. *Genet Vaccines Ther* **2**:8.