



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Inibição da replicação do vírus da dengue em células de mamíferos

Aluna: Patrícia Tiemi Fujimura

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Co- Orientadora: Dra. Lara Vecchi

UBERLÂNDIA – MG

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Inibição da replicação do vírus da dengue em células de mamíferos

Aluna: Patrícia Tiemi Fujimura

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Co- Orientadora: Dra. Lara Vecchi

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em
Genética e Bioquímica (Área
Genética)**

UBERLÂNDIA – MG

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E

Inibição da replicação do vírus da dengue em células de mamíferos

Aluna: Patrícia Tiemi Fujimura

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira (Orientador)

Examinadores: Margareth de Lara Capurro

Myrna Bonaldo

Jonny Yokosawa

Rafael Nascimento

Data da Defesa: 28/07/2014

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese primeiramente a Deus por me dado sabedoria para entender as situações divergentes, paciência para aceitar o aquilo que não posso compreender e coragem para eu continuar. Dedico também esta tese ao meus familiares (pai, mãe, irmão e meu companheiro Carlos Henrique Baziza e familiares) que me apoiaram nos momentos difíceis e importantes da minha vida

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Carlos Ueira, pela oportunidade, confiança, e, principalmente, pelo exemplo de dedicação e de vontade de fazer pesquisa;

Ao prof. Luiz Ricardo Goulart pela oportunidade de conhecer a pesquisa na UCDavis, apoio e disponibilização do laboratório para a realização desta pesquisa

À minha co-orientadoda, Lara Vecchi, pela amizade e oportunidade belíssima de ensinamento sobre a biotecnologia celular

Às minhas amigas e amigos do laboratório de nanobiotecnologia , (Luciana, Paty Terra, Karina, Mayara, Cláudia, Bruna, Paula Souza, Fabys, Larissa, Tamara, Hebreia, Aline Gomes, Jéssica, ..., Flávio, João Paulo, Galber ...), e toda equipe pelo carinho e pela ajuda nos momentos difíceis da pesquisa;

Ao prof. Jonny e Guilherme pelo auxílio e doação do material viral e celular.

Ao meus amigos do (Nati, Celito, Carol, Denis, Xitos) Laboratório Labgen, meu carinho e minha gratidão pelos momentos de risadas e diversão

Ao prof. Luiz Carlos por ter me proporcionado uma vida nova, ao cuidar da minha saúde mental

Aos professores do INGEB pelo ensinamento, troca de sorriso e bom dia nos corredores do departamento.

Aos colegas da secretaria Madson, Ismair, Neirivalda pelas conversas e auxílio de material.

A Valéria e Zu pelas orações e belas palavras

*Ao Fausto Capparelli e Ângela Sena, pela amizade sincera e
carinho;*

*A Carol Reis, Emília e Carlos Jr pela fraternidade, amizade,
carinho, mas principalmente, por ter doado parte de seu tempo para a
conclusão desse trabalho;*

*A todos os meus amigos que me proporcionaram momentos de
alegria;*

A CAPES pela bolsa de doutorado;

A UFU por oferecer um ensino e pesquisa de qualidade;

Sumário

Abstract.....	12
Apresentação Geral.....	14
CAPÍTULO I.....	16
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
1. Vírus da Dengue.....	17
1.2. Epidemiologia do vírus da dengue.....	17
1.3. Estrutura.....	18
2. Ciclo de replicação viral e a importância da Proteína NS1.....	20
2.2. Proteína NS1.....	22
2.3. Tradução, montagem e liberação viral.....	23
2.4. Degradação de proteínas mal enoveladas.....	25
2.5. Ubiquitina Ligase E3.....	30
3. Aplicação biotecnológica contra o vírus da dengue.....	32
3.2. Vacinas.....	32
3.3. Drogas antivirais.....	33
3.4. Anticorpos Monoclonal Neutralizantes.....	34
3.5. Biotecnologia aplicada a vetores.....	35
Objetivo Geral.....	37
Objetivos específicos:.....	37
Referências.....	38
CAPÍTULO II.....	51
(Produção de anticorpos inibidores da replicação viral).....	51
Revista: <i>mAbs</i> (Landes Bioscience):.....	52
Título: Produção de anticorpos inibidores da replicação viral.....	52
Abreviaturas:.....	52
Resumo:.....	52
Introdução.....	53
Resultados.....	55
Seleção de anticorpos recombinantes contra a proteína do envelope do vírus da dengue e contra a proteína NS1 por <i>Phage Display</i>	55
Subclonagem dos clones de scFv selecionados em vetor de expressão (pcDNA3) em células de mamífero.....	57
Análise da expressão de scFv solúvel dos clones celulares.....	59
Reatividade do scFv produzido na cultura de célula contra o vírus ou NS1.....	60
Análises <i>In silico</i>	61

Co-localização do anticorpo F3 _{NS1} produzido pela célula e a proteína NS1	65
Teste da infectividade viral	67
Quantificação do título viral por tempo real.....	67
Teste da atividade anti-viral.	68
Quantificação das proteínas E e prM após 24 horas da infecção.....	70
Teste de inibição para o vírus da dengue tipo 2	70
Discussão	71
Material e Métodos:	76
Referências.....	86
CAPÍTULO III.....	90
INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL VIA DEGRADAÇÃO PROTEASOMAL DE PROTEÍNA ESPECÍFICA DO VÍRUS DA DENGUE	90
Revista: Journal of Virology	91
Resumo:	91
Introdução:.....	91
Resultados:.....	93
Construção do sistema de degradação viral:	93
Análise da expressão do sistema de degradação viral:	95
Análise da inibição da replicação viral em 1 e 3 dias.....	96
Teste da inibição com o vírus da dengue tipo 2.....	100
Discussão	101
Material e Métodos:	104
Referências:.....	112

LISTA DE FIGURAS
(Fundamentação Teórica)

Figura 1 - Distribuição geográfica da dengue no mundo em 2013	18
Figura 2- Representação esquemática do genoma viral.	19
Figura 3 - Esquema da morfologia do vírus da dengue e da proteína E.....	20
Figura 4: Modelo para o processo de fusão na membrana pelo vírus	21
Figura 5- Poliproteína do vírus da Dengue.....	24
Figura 6- Tradução e translocação da proteína para o lúmen do retículo endoplasmático.....	25
Figura 7 - Representação esquemática do complexo ubiquitina-ligase E3 envolvendo ERAD em <i>S. cerevisiae</i> e seus respectivos substratos.....	28
Figura 8 - Sistema de proteasoma/ubiquitina de Levedura.	30
Figura 9- Representação esquemática do reconhecimento de proteínas mal enoveladas pelo complexo HRD1.....	31
Figure 10 - Representação dos tipos de vacina.	33

ABREVIATURA

ADE- *antibody-dependent enhancement* – aumento dependente de anticorpos

ATCC- *American Type Culture Collection*

C- proteína do capsídeo viral

Cnx-Calnexina

Crt- Calreticulina

DENV- Vírus da dengue

DF- *Dengue Fever* – Dengue Clássica ou Febre da Dengue

DHF- *Dengue Hemorrhagic Fever* ou Dengue Hemorrágica

DI, DII, DIII – domínio I, II, III

DSS- Dengue Shock Syndrome- Síndrome do Choque da Dengue

E- proteína E

eIF- Fator de iniciação em eucariotos

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay* – ensaio imunoenzimático

ERAD- *Endoplasmatic Reticulum- associated degradation*- Degradação associadas ao Retículo Endoplasmático.

KDa- quilo Daltons

LB - Luria-Bertani

M - proteína M

m7GpppAmG – metilguanosina cap do tipo I

NS- proteína não estrutural

OMS ou WHO- Organização Mundial da Saúde / *World Health Organization*

ORF – *Open Read Frame* – Fase aberta de leitura

PAHO- Organização Pan-Americana de Saúde

PBS- tampão fosfato de sódio

PCR – Reação de cadeia de polimerase

PEG- polietilenoglicol

qPCR- PCR quantitativo

RdRp-*RNA-dependent RNA polymerase* – RNA polimerase dependente de RNA

RE- Retículo Endoplasmático

scFv- *Single Chain Fragment variable*- fragmento variável da cadeia do anticorpos

SRP- signal recognition signal- partícula de reconhecimento de sinal

UPR- *Unfolded Protein Response*- Resposta a proteínas mal enoveladas

UTR- *untranslated region*- região não codificante

Abstract

Dengue is the most important mosquito-borne viral disease in tropical and subtropical areas and has become a global threat affecting around 100 countries in the world. Dengue virus infection can be manifested by the self-limited febrile illness known as dengue fever (DF) or by a severe complication caused by the hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS). Although, much research has been done in Dengue, currently, there is no licensed antiviral agent to defend against the dengue. Thus, development of therapeutic strategies is needed to fight against the virus. In this study we selected by Phage Display an antibody fragment capable to recognize the viral envelop protein and viral structural protein NS1 and inhibit the virus replication. Envelope proteins are on the surface of the dengue virion and play a key role in cell entry; the structure of the protein will affect the way that the virus can interact with the host cell. Given their key role in host cell entry, antiviral mechanisms that target E proteins has been proposed by many research. NS1 is a versatile nonstructural glycoprotein that is expressed on the cell surface and secreted into the extracellular space. The intracellular NS1 has been associated with early steps of viral replication, since it can be found co-localized together dsRNA and other nonstructural protein like NS3 and NS5. Furthermore, we development an approach to degrade the NS1 and viral envelop protein when scFv is fused to the SEL1L molecule (scFv viral-degradin). SEL1L is a component of HRD1 complex, which is involved on the Quality Control protein process of the endoplasmatic reticulum (ER). This molecule (SEL1L) is able to recognize and to translocate protein with misfolded luminal domains to proteasome. After three round of selection, selected cDNAs encoding antibody fragments (scFv) were subcloned into an expression vector in mammalian cells to produce scFv in soluble form or to produce scFv fused to the SEL1L molecule (scFv viral-degradin). In our study for study of scFv against NS1, we performed immunofluorescence to co-localize the soluble scFv with NS1 at the infected cell. In addition to we, also, performed Western blot to verify the specific degradation and qPCR to quantify the new production of viral particle after the incubated with our soluble scFv and scFv viral-degradin. Our results showed that the soluble antibody scFv co-localizes with NS1 inside the cell, probably in the

viral replication complex, and it is able to block the viral replication in more than 90%. Moreover, the scFv viral-degradin degraded the specific molecule (NS1) and it was, also, able to inhibit the new viral particle production in more than 90%. Furthermore, we also verified that scFv against viral envelope protein was able to block the viral replication in more than 90% in soluble scFv and fused in SEL1L. Therefore, this soluble scFv and scFv viral-degradin may be the potential tools to combat dengue virus replication.

Apresentação Geral

Dengue é uma doença infecciosa causada por um vírus da família Flaviridae e é transmitido através da picada do mosquito infectado *Aedes aegypti*. Atualmente, a dengue é considerada um dos principais problemas de saúde pública de todo o mundo. Classicamente, há 4 sorotipos virais, sendo que o tipo 5 foi recém-descoberto em macacos de florestas da Malásia e teria sido detectado apenas um caso em ser humano. As manifestações clínicas da Dengue são variáveis, indo de infecção assintomática e quadros febris autolimitados (Febre da Dengue ou clássica- DF) até síndrome hemorrágica com choque (Febre da Dengue Hemorrágica- DHF ou Síndrome do choque da Dengue – DSS). Atualmente, não existe vacina disponível para os quatro tipos contra a dengue, sendo necessária a adoção de medidas preventivas contra a doença, como por exemplo, evitar a proliferação do vetor. Neste sentido, neste trabalho, descrevemos o desenvolvimento de dois mecanismos capazes de inibir *in vitro* a replicação do vírus da dengue. O primeiro envolveu a seleção de fragmentos de anticorpos (scFv) por *Phage Display* e a expressão dessas moléculas na célula vero. As células transfectadas para a produção de anticorpos solúveis, tornaram-se capazes de se ligar ao envelope viral ou na molécula de NS1 presente no complexo de replicação, inibindo a formação de novas partículas virais. No segundo mecanismo, os scFv selecionados no primeiro trabalho foram subclonados no sistema degradina. Este sistema envolve a substituição da região N-terminal da SEL1L pelos scFvs produzindo proteínas recombinantes capazes de reconhecer as proteínas específicas do vírus e translocá-las para ser degradadas pelo proteasoma. SEL1L é uma molécula presente no complexo

HRD1 da Ubiquitina ligase E3 dos mamíferos, a qual está envolvida no mecanismo de degradação de proteínas mal-enoveladas do retículo endoplasmático (ERAD). Ela é responsável pelo reconhecimento do domínio errado da conformação nativa, promovendo, juntamente com outras moléculas, a ubiquitinação e retrotranslocação para o proteasoma. A substituição do domínio de reconhecimento do mal enovelamento por um fragmento de anticorpo específico a uma proteína do vírus permite, assim, a degradação dessa proteína alvo inibindo, também, a formação de novos vírus.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Vírus da Dengue

1.2. Epidemiologia do vírus da dengue

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2013, a dengue é considerada a mais importante doença arboviral, sendo apresentada como patologia de rápida dispersão através da picada do mosquito vetor¹. O rápido afloramento da doença, surgindo como potencialmente epidêmica, tem preocupado as autoridades sanitárias do mundo todo, já que dados estatísticos mostram que metade da população mundial vive em regiões endêmicas ou em regiões de risco.^{1;2}

Clinicamente, a dengue pode variar desde infecção assintomática a manifestações graves presente na Síndrome do choque da Dengue (DSS). Os sintomas clássicos da Dengue (Febre da Dengue –DF) são febres semelhantes a outras infecções virais, mialgia e artralgia, dor retroorbital, cefaléia, anorexia, náuseas, vômitos, prostração, além de manchas cutâneas, podendo assim ser confundida com sarampo ou rubéola. Já a forma mais grave, representada pela Dengue Hemorrágica (DHF) e Síndrome do Choque da Dengue (DSS), apresentam hemorragias, dores abdominais intensas, palidez cutânea, sonolência, dificuldade respiratória, pulso rápido e fraco, podendo levar o paciente ao choque e à morte. Além disso, pode apresentar aumento da permeabilidade por má função vascular endotelial, com extravasamento de líquidos para o interstício, causando queda da pressão arterial e manifestações hemorrágicas, associadas à trombocitopenia. Conseqüente a estas manifestações surgem hemoconcentração com redução da volemia, má perfusão tissular e hipóxia^{1;3}.

Atualmente, estima-se que mais de 3,6 bilhões de pessoas vivem em áreas tropicais e subtropicais (Figura 1), onde o vírus da dengue é potencialmente transmitido, acarretando 50 a 100 milhões de casos de infecções por dengue, sendo que aproximadamente 500 mil episódios graves, e mais de 20 mil relatos de ocorrência anual da dengue^{1;2;4;5}.

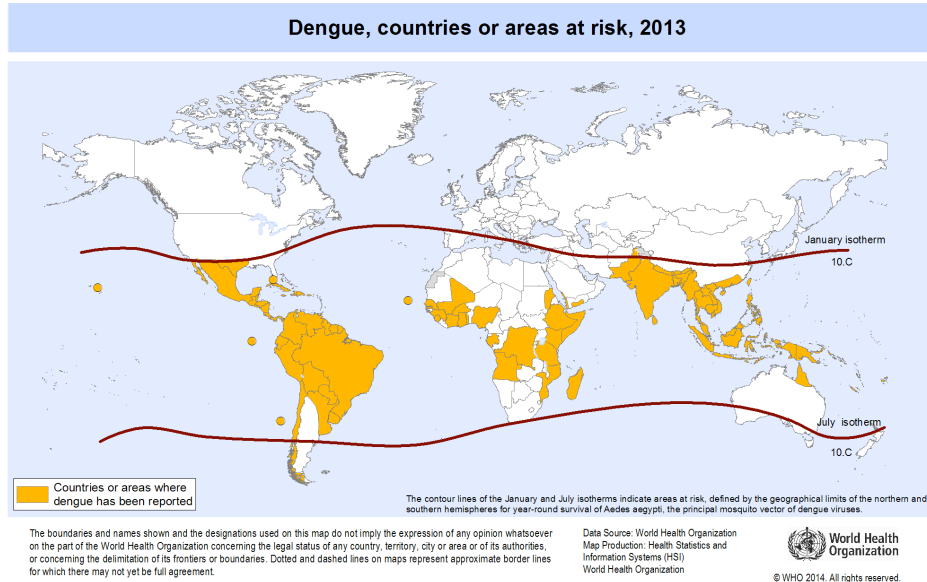


Figura 1 - Distribuição geográfica da dengue no mundo em 2013. Dado fornecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Acessível em: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png. Acessado no dia 18 de maio de 2014⁶.

No Brasil, dados fornecidos pela Organização Pan-Americana de Saúde e apresentado no congresso *Cooperation among early adopter countries for Dengue Vaccines*, em, Bangkok, Thailand, mostraram que, no ano de 2013, 1.476,917 casos foram notificados no país novos, sendo que, deste total, 6.566 casos foram identificados como casos graves e 573 foram a óbitos^{7; 8}.

O custo econômico total referente a dengue nos países Americanos, no período de 2000-2007, foi de 2,1 bilhões de dólares por ano, sendo o Brasil responsável por 40,9% do custo total, e no ano de 2013, o ministério da saúde relatou um gasto de 15,7 milhões de dólares somente com a dengue⁴.

1.3. Estrutura

Membro da família Flaviviridae e do gênero *Flavivirus*, o vírus da dengue (DENV) é um vírus de RNA de fita positiva envelopado cujo genoma possui aproximadamente 11kb e apenas uma fase codificante (ORF). Essa sequência é flanqueada por duas regiões não-codificantes (UTR), 5' e 3'-UTR, sendo que a 5'-UTR apresenta a estrutura 7-metilguanossina cap do tipo I (m7GpppAmG). Ambas as regiões apresentam elementos estruturais e funcionais responsáveis pela

tradução da poliproteína e pela replicação viral (Figura 2)⁹. O genoma viral codifica uma poliproteína contendo três proteínas estruturais (C, E, M) e sete não estruturais (NS1; NS2A; NS2B; NS3; NS4A; NS4B e NS5)¹⁰.

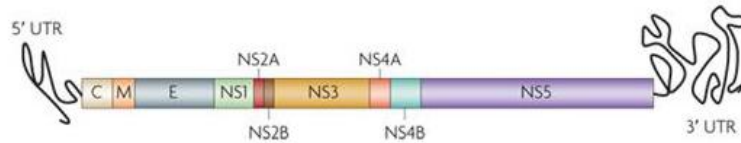


Figura 2- Representação esquemática do genoma viral. RNA viral contendo genes codificadores para três proteínas estruturais: o capsídeo (C), a membrana (M) e o envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Retirado de Guzman, M.G. *et al.* 2010¹⁰.

Atualmente, existem 4 sorotipos do vírus (dengue 1-4), sendo todos constituídos por uma partícula esférica de aproximadamente 50 nm de diâmetro, contendo um nucleocapsídeo de 30 nm, circundado por um envelope lipídico. No envelope viral estão contidas proteínas estruturais constituídas por Capsídeo viral (C), glicoproteínas do envelope (E) e glicoproteínas de membrana (M) (Figura 3)¹⁰.

A glicoproteína E é a maior de todas as moléculas estruturais, e é responsável pela interação e entrada do vírus na célula. Esta região contém determinantes antigênicos expostos na superfície do vírus, os quais são alvos de estudos para o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes e produção de vacinas^{11; 12}. A proteína E é constituída de três domínios (EDI, EDII e EDIII). O domínio EDIII é um peptídeo contínuo estendido do EDI. Este domínio possui conformação semelhante ao domínio imunoglobulínico (Ig), sendo considerado uma região importante para a interação com os receptores celulares. Já os EDI e EDII são sequências descontínuas e conectadas por quatro peptídeos *linkers* que formam o anel EDI/EDII^{13; 14}.

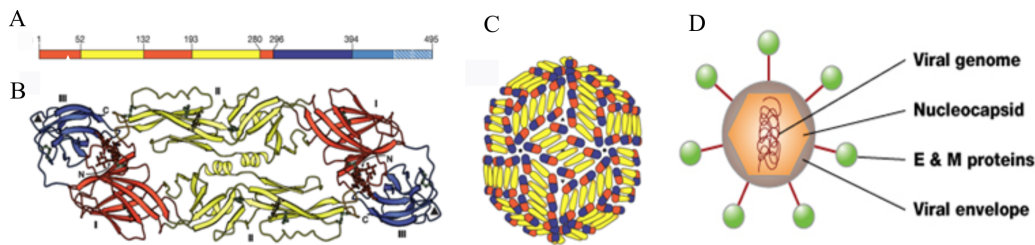
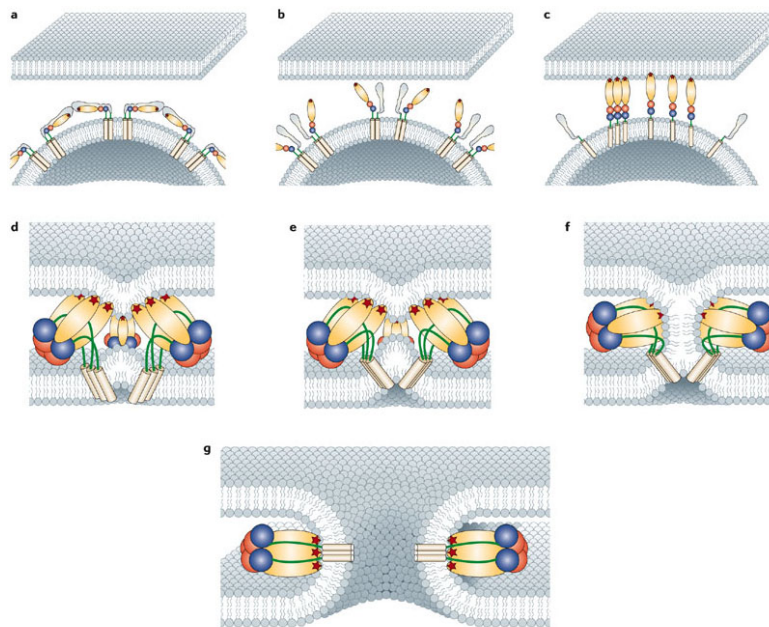


Figura 3 - Esquema da estrutura do vírus da dengue e da proteína E. A – Representa a sequência linear da proteína E. Em vermelho representa o domínio I, em amarelo DII e em azul DIII. B - Representa a estrutura conformacional da região E na partícula madura do vírus. C- Organização das moléculas da proteína E na superfície do vírus. D- Representação esquemática do vírus. O vírus da dengue possui uma forma aproximadamente esférica. No interior do vírus existe o a nucleocapsídeo, que é feito do genoma viral e da proteínas C. O nucleocapsídeo é coberto por uma estrutura chamada de envelope viral, a qual contém uma bicamada lipídica feita a partir da membrana da célula hospedeira. Embutidas na bicamada lipídica estão proteínas E e M. A proteína E formam uma camada protetora exterior, que controla a entrada do vírus nas células humanas. Figuras retirada de Modis, Y et al¹⁴ e Nature Education, acessível: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>. Acessado: 2 maio de 2014¹⁵.

A proteína M, derivada do precursor prM, funciona como uma chaperona no processo de maturação da partícula¹⁶. O nucleocapsídeo é composto por proteínas do capsídeo (C), as quais são proteínas altamente básicas e com afinidade ao RNA genômico¹⁷.

2. Ciclo de replicação viral e a importância da Proteína NS1

A entrada do vírus da dengue na célula ocorre via endocitose mediada por receptores dependente da proteína clatrina. Tais receptores estão presentes na superfície celular (células dendríticas, monócitos e macrófagos) e associa-se, principalmente, com o domínio III da proteína E do envelope^{13; 18}. Essa interação promove a internalização e subsequentemente a fusão do envelope com a membrana endossomal mediada pela diminuição do pH vesicular¹⁹. Basicamente, a diminuição do pH endossomal, promovida pela bomba vATPase, promove mudanças conformacionais que levam à dissociação dos dímeros da proteína E em monômeros, seguida de sucessiva associação dessa proteína em trímeros para formar um *loop* de fusão (Figura 4)^{14; 20}.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Figura 4: Modelo para o processo de fusão na membrana pelo vírus: (a) Depois da ligação do vírus ao receptor, ocorre a diminuição do pH no endossomo, (b) promovendo a mudança conformacional. (c) Trimerização da proteína é seguida pela interação da proteína de fusão e membrana, promovendo o (d) dobramento da membrana do hospedeiro. (e) Formação da haste de hemifusão e, finalmente, a (f) fusão da membrana viral com a membrana do endossomo. Figura retirada do artigo, Kielian, M et al, 2006²¹.

A fita positiva de RNA do DENV, após ser liberada, é transportada para a superfície do retículo endoplasmático rugoso, onde inicia-se a síntese da poliproteína, as quais posteriormente serão clivadas.

As proteínas não estruturais estão envolvidas nos subseqüentes ciclos de síntese de RNA (replicação), montagem da partícula viral e modulação da resposta imune da célula do hospedeiro. Os elementos NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B e NS5 do DENV formam o complexo de replicação viral²².

NS3 é a proteína que apresenta maior número de atividades. Esta proteína contém um domínio N-terminal com atividade proteolítica, o qual cliva a poliproteína viral, via região atividade serino protease, dependente do cofator NS2B. Além disso, possui uma atividade de rompimento da estrutura secundária no RNA ou da dupla fita de RNA pela ação da helicase na região C-terminal da proteína. NS2A colocaliza-se com dsRNA, NS1, NS3 e NS5 no complexo de replicação e foi previamente descrita como molécula importante para a replicação

viral, montagem e liberação do vírus. NS4A, em conjunto com outros fatores virais e do hospedeiro, induz o rearranjo da membrana celular^{23; 24}, levando a formação de vesículas originadas pela invaginação do retículo endoplasmático²⁵. As vesículas formadas, provavelmente, servem como sítios de replicação do RNA viral, em que o material genômico associa-se com as proteínas do complexo de replicação²⁶.

O processo inicia-se, então, com a síntese *de novo* da fita intermediária negativa de RNA, que serve como molde para a produção da fita positiva do RNA genômico. A síntese é catalisada pela proteína NS5, a qual possui uma atividade de RNA polimerase dependente de RNA, em associação com as proteases/helicases viral (NS3) e fatores do hospedeiro^{27; 28; 29}.

O RNA neo-sintetizado associa-se com a proteína C do capsídeo viral por mecanismos ainda não conhecidos. O complexo RNA-proteína C brota do lúmen do retículo endoplasmático, adquirindo uma bicamada lipídica e as proteínas virais E e prM. Ocorre, em seguida, a proteólise da proteína prM mediada por Furina no complexo de Golgi³⁰, desencadeando rearranjos, homodimerização e formação da nova partícula viral³¹.

A eficiência da síntese de RNA é regulada por elementos presentes na região 5' e 3' do RNA (elementos-cis) e por componentes essenciais do complexo de replicação viral, além de fatores do hospedeiro (elementos-trans), que funcionam como promotores, *enhancers* e repressores da replicação e síntese proteica viral⁹.

2.2. Proteína NS1

Em especial, a NS1 é uma glicoproteína conservada com 48KDa e com seis ligações dissulfeto intramoleculares. Esta proteína é sintetizada como um monômero, seguida de dimerização após modificações pós-traducionais, tais como adição de resíduos de carboidratos no lúmen do retículo. Após o processamento, o dímero de NS1 pode localizar-se no interior da célula, no sítio de replicação viral, na superfície celular ou ainda ser secretada no meio extracelular³².

A maioria das moléculas de NS1 associada à célula co-localiza-se com o dsRNA junto ao complexo de replicação viral, a qual demonstra ter um papel

essencial, atuando como cofator da síntese de RNA viral. Porém, a sua função na replicação ainda precisa ser esclarecida^{33; 34}.

A NS1 secretada caracteriza-se como uma lipoproteína hexamérica, que possui um núcleo (core) rico em lipídios ligados entre si por interações hidrofóbicas³². Essa proteína secretada, juntamente com NS1 de superfície celular são caracterizadas como moléculas altamente imunogênicas³⁵.

Por ativarem o sistema imune, a NS1 circulante tem sido considerada um importante marcador de diagnóstico de infecção, principalmente, durante a fase aguda, que ocorre do 1º ao 7º dia após o aparecimento dos primeiros sintomas da doença. Os níveis desta proteína podem variar entre os indivíduos durante o curso da doença, sendo que a taxa pode oscilar entre nanogramas a microgramas por mililitros de soro com picos ocasionais de 50 µg/mL. Dessa forma, a presença de NS1 circulante no soro permite a detecção precoce da infecção viral³⁶.

2.3. Tradução, montagem e liberação viral

O vírus da dengue, assim como todos os vírus, utilizam a maquinaria das células hospedeiras para realizar o processo de produção de proteínas. A síntese das proteínas do vírus da dengue inicia-se tanto por uma via cap-dependente (tradução canônica) quanto por uma via cap-independente (tradução não-canônica). A tradução, que utiliza o genoma RNA positivo viral como molde, ocorre no retículo endoplasmático e culmina com a formação da poliproteína³⁷.

A via de tradução cap-dependente ocorre através de dois eventos, envolvendo a metilação do RNA para formar a estrutura cap de 7-metilguanosina do tipo I (m7GpppAmG), realizada pela atividade da proteína NS5, e pela formação do complexo de tradução. A estrutura cap é reconhecida pelo fator de iniciação de eucarioto 4E (eIF4E) que recruta outros fatores como eIF4G e a helicase, formando um complexo de tradução. A associação do eIF3 com este complexo permite a ligação do complexo pré-inicial 43S ribossomal, responsável pela identificação do códon inicial. Em seguida, a associação com a subunidade 60S leva à formação do complexo ribossomal competente para a elongação da poliproteína, nomeado complexo 80S. Para aumentar a eficiência do início da tradução, mesmo na falta de uma cauda poli-adenilada (poli-A), o genoma viral apresenta uma região 3'UTR, a qual se ligam proteínas de ligação a poli-A,

modulando e facilitando a síntese da proteína^{38; 39}.

No entanto, quando ocorre a redução ou a falta de eIF4E, o vírus consegue utilizar a via não canônica de tradução proteica (tradução cap-independente) em que o complexo da partícula de ribonucleoproteína (RNP) conecta as regiões UTRs 5' e 3' do vírus da dengue. Nesta conformação, a estrutura do RNA ou as sequências presentes na 3'UTR recrutam ou estabilizam os fatores de tradução inicial na região 5'. Este complexo recruta outros fatores, tais como eIF4G e eIF4A, para a realização da tradução³⁷.

O processamento da poliproteína ocorre pela ação de proteases virais e celulares, liberando proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais estão localizadas na porção N-terminal, seguidas das não estruturais (Figura 5). A porção C-terminal das proteínas estruturais contém uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos que funciona como peptídeo sinal para inserção na membrana do retículo endoplasmático. Em cada junção das proteínas contém um sítio de clivagem onde atuam as proteases⁴⁰.

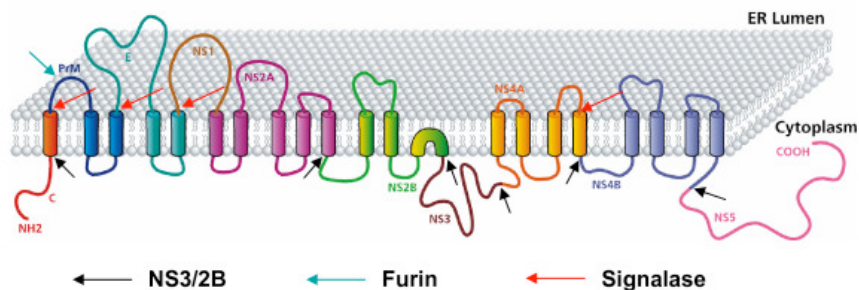


Figura 5- Organização da poliproteína do vírus da dengue. O esquema representa a poliproteína do vírus da dengue localizada na membrana do retículo endoplasmático. As setas representam as regiões onde as proteínas serão clivadas por proteases virais (seta preta) ou do hospedeiro (seta azul e vermelha). Figura adaptada do artigo Umareddy *et al.* 2007⁴¹.

A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático rugoso. O RNA genômico nascente associa-se com as proteínas C, formando o complexo RNA-capsídeo. Em seguida, esse complexo associa-se à membrana do retículo endoplasmático, a qual contém as proteínas E e prM, dando origem ao vírus imaturo²⁵. Estas partículas imaturas são transportadas através da via secretória

celular, onde a protease celular Furina cliva a proteína prM em pr e M, resultando na liberação de peptídeos pr e a formação do vírus maduro^{31; 42}. Os peptídeos pr permanecem associados com a proteína E, provavelmente, para prevenir a fusão prematura da partícula durante a secreção, e são liberadas somente depois que o vírus tenha saído da célula^{42; 43}.

2.4. Degradação de proteínas mal enoveladas

O retículo endoplasmático (RE) é um compartimento especializado que promove o enovelamento e maturação de 30% das proteínas recém-sintetizadas^{44; 45}.

A maioria das proteínas secretadas ou de membrana apresentam uma região N-terminal com domínio hidrofóbico, que assegura o seu encaminhamento ao RE. A tradução inicia-se no citosol pelos ribossomos e, ao codificar a sequência sinal, esta é reconhecida pela partícula de reconhecimento do peptídeo sinal (signal recognition particle – SRP), e, posteriormente, o complexo (polipeptídeo associado ao SRP) liga-se ao receptor de SRP. Este reconhecimento promove o deslocamento do polipeptídeo nascente para o lúmen do retículo através do canal de SEC61⁴⁶ (Figura 6).

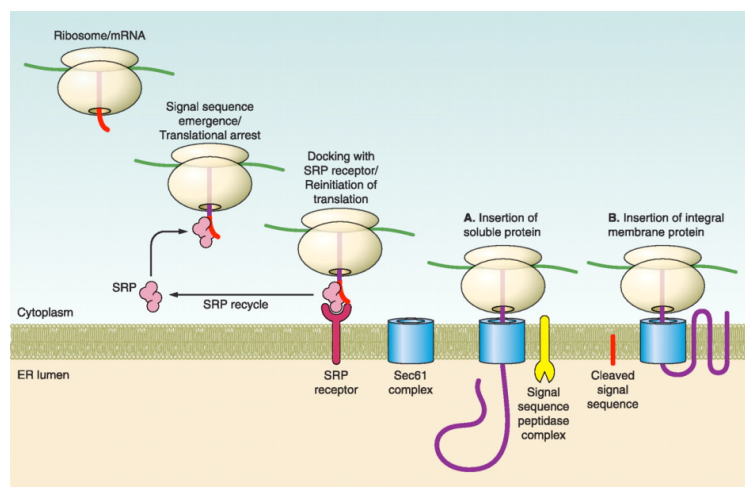
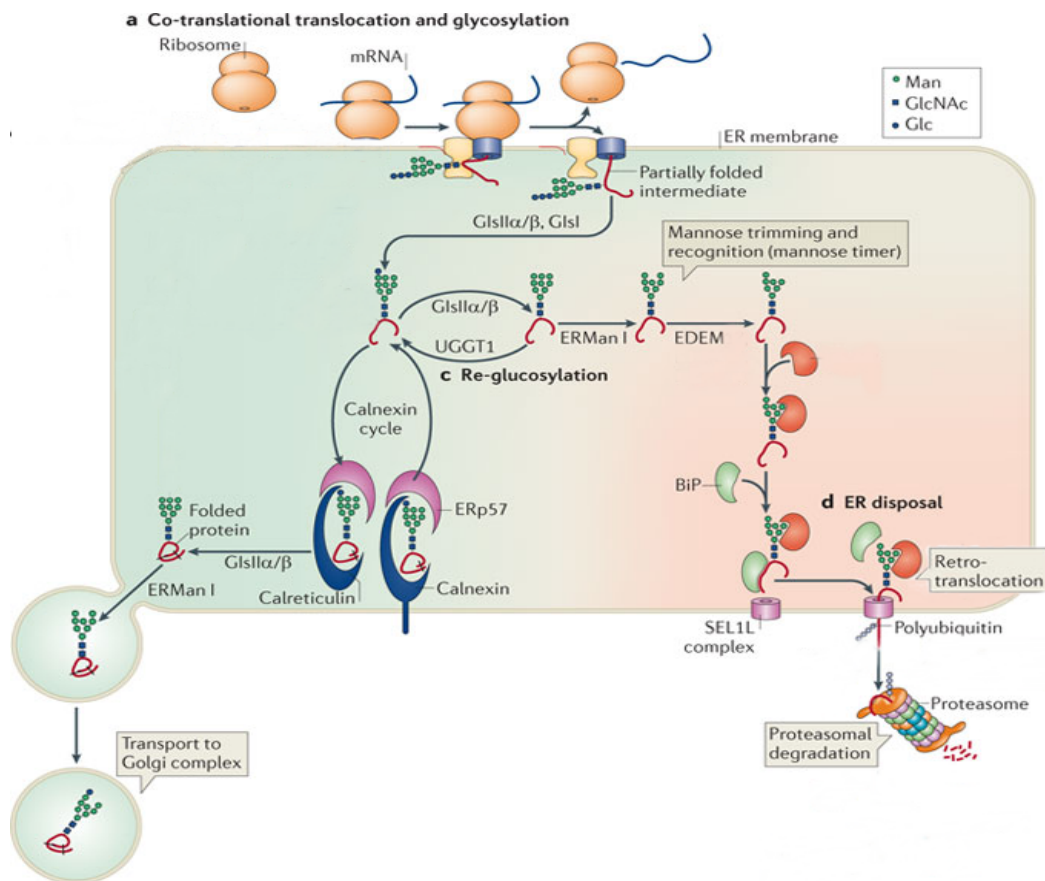


Figura 6- Tradução e translocação de proteína para o lúmen do retículo endoplasmático. A proteína nascente emerge do ribossomo com uma sequência de sinal hidrofóbica é reconhecida pela partícula de reconhecimento de sinal (SRP). A ligação do SRP com a sequência faz com que o complexo ribossômico juntamente com a cadeia nascente interaja com o receptor SRP presente na membrana do retículo endoplasmático (RE). A proteína solúvel nascente (A) é translocada para o lúmen do ER através do complexo de translocação Sec61. Figura retirada do artigo Guerriero C J & Brodsky JL. 2012⁴⁷.

As proteínas recém-sintetizadas são, em seguida, submetidas ao mecanismo de controle de qualidade do RE, uma vez que podem adquirir falhas na sua conformação nativa, seja por erro genético, *stress* celular ou eventos estocásticos que prejudicam a célula⁴⁸. O acúmulo de grandes quantidades de proteína, erros no seu enovelamento ou falhas na finalização de formação de complexos multiproteicos promovem a formação de agregados de proteínas tóxicas, as quais ficam retidas no interior do RE. Para contrabalançar o efeito danoso do acúmulo das proteínas mal enoveladas, dois mecanismos de sistema de qualidade são ativados: Resposta a proteína não enovelada (*Unfolded Protein Response* - UPR) e a Degradação de proteínas mal enoveladas (*Endoplasmatic Reticulum associated degradation*-ERAD)⁴⁹.

A ativação da UPR promove o aumento da síntese de proteínas específicas, que melhoram a capacidade de biossíntese do RE, tais como as chaperonas (BiP, Erdj, Grp90, etc), aliviando o *stress* do RE pelo aumento da capacidade de enovelamento. Concomitantemente, as proteínas aberrantes são reconhecidas especificamente e exportadas para o citoplasma pelo sistema ubiquitina/proteasoma⁴⁸.

Durante o mecanismo de ERAD, as proteínas mal enoveladas são entregues ao proteasoma 26S presente no citoplasma. A destruição da proteína pelo ERAD requer o reconhecimento do polipeptídeo via ubiquitinação (Figura 7)⁵⁰.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 7 - Enovelamento e degradação das proteínas mal-enoveladas. A figura representa a co-tradução, translocação, glicosilação, transporte das proteínas nativas e degradação das proteínas mal enoveladas pela ação do reconhecimento e translocação da SEL1L presente no complexo HRD1. Após a translocação das proteínas ocorre a ubiquitinação e degradação via proteassoma. Figura adaptada de Moremen, K W, et al, 2012⁵¹.

Em leveduras, três diferentes vias de ERAD têm sido propostas dependendo da localização celular e do domínio mal enovelado da proteína (Figura 7). A primeira via corresponde ao ERAD-C, que degrada proteínas nucleares e proteínas do citoplasma com domínios mal enovelados no lado citosólico. A segunda via, o ERAD-M, degrada proteínas que apresentam domínios transmembrânicos mal enovelados e por último o ERAD-L degrada proteínas cujos erros do domínios encontra-se no lúmen do RE (Figura 8)^{52; 53}.

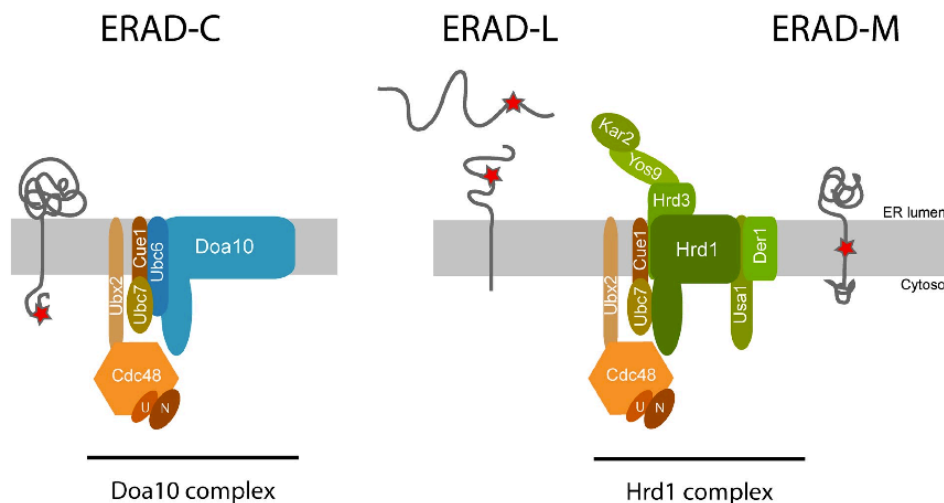


Figura 8 - Representação esquemática do complexo ubiquitina-ligase E3 envolvendo ERAD em *S. cerevisiae* e seus respectivos substratos. Os eventos que definem qual o complexo do ERAD a ser utilizado é a localização do domínio mal enovelado, representado pela estrela vermelha. O reconhecimento do substrato, retrotranslocação e ubiquitinação são coordenadas por um complexo ligase E3 incorporado à membrana. As proteínas do RE com um domínio mal enovelado no citoplasma (substratos ERAD-C) são degradados por meio do complexo Doa10. Proteínas apresentando domínios luminal (ERAD-L) ou intramembrana (ERAD-M) errados são degradados através do complexo Hrd1. Figura extraída do artigo de Ruggiano A et al., 2014⁵⁴.

O mecanismo de ERAD mais bem elucidado é o de degradação das glicoproteínas mal enoveladas presentes no lúmen do RE da *Saccharomyces cerevisiae*⁵⁵ e de mamíferos^{56; 57}. Nestes mecanismos, as proteínas que entram no lúmen do RE recebem, nos resíduos de asparagina, três moléculas de glicose, nove de manose e dois resíduos de N-acetilglicosamina. Essas moléculas denominadas de N-glicanos promovem o aumento da solubilidade e previnem a agregação das proteínas nascentes⁵⁴.

As moléculas de glicose presente nos N-glicanos são, subsequentemente, clivadas por várias enzimas, tais como as glicosamidas (glicosidase), as quais permitem a interação das glicoproteínas com os domínios lectínicos presentes nas chaperonas calreticulina (Crt) ou calnexina (Cnx). Crt e Cnx facilitam o processo de enovelamento das proteínas recém-sintetizadas sendo que às vezes são necessários vários ciclos de interação com Crt e Cnx para que a proteína adquira a conformação apropriada⁵⁸. As proteínas corretamente enoveladas são exportadas para o Complexo de Golgi, onde serão encaminhadas para seu destino final^{59; 60}. As proteínas com erro de enovelamento, entretanto, ficam retidas no lúmen do RE onde estarão sujeitas à ação das enzimas manosidases (Htm1 para levedura⁶¹ e EDEM para mamíferos⁶²), que clivam os resíduos de

manose para aumentar a hidrofobicidade e expor as regiões hidrofóbicas normalmente escondidas nas proteínas com conformação nativa. A exposição das sequências hidrofóbicas permite o reconhecimento dessa regiões por chaperonas (YOS-9 em levedura⁶¹ e OS-9 em mamífero⁶³) presentes nas células. As proteínas associadas a tais chaperonas se ligam, posteriormente, ao complexo Hrd1 (Hrd1p-Hrd3-Der1p em leveduras e Hrd1-SEL1-Derlin-1 em mamíferos), que promoverá a retrotranslocação, provavelmente via Derlin-1, proteína participante do complexo de ubiquitina-ligase. Durante o processo de retrotranslocação, a proteína é ubiquitinilada pelo lado citosólico do RE, assegurando, assim, a eficiência da entrega para o proteasoma⁶⁴.

A ubiquitinação ocorre por meio de um complexo múltiplo enzimático composto pela enzima de ativação de ubiquitina (E1), enzima de conjugação de ubiquitina (E2) e ubiquitina ligase (E3). A enzima E1 promove a ativação dependente de ATP da região C-terminal da ubiquitina. Em seguida, ocorre a transferência da ubiquitina para o sítio ativo conservado de cisteína da E2 através da reação de transesterificação. Posteriormente, E3 promove a transferência da cauda de ubiquitina a proteína^{65; 66}. A cauda de ubiquitina é, então, reconhecida pelo complexo Cdc48/p97 ATPase, o qual força o deslocamento do substrato ubiquitinilado ao citosol onde é degradado pelo proteasoma (Figura 8)^{67; 68; 69; 70}.

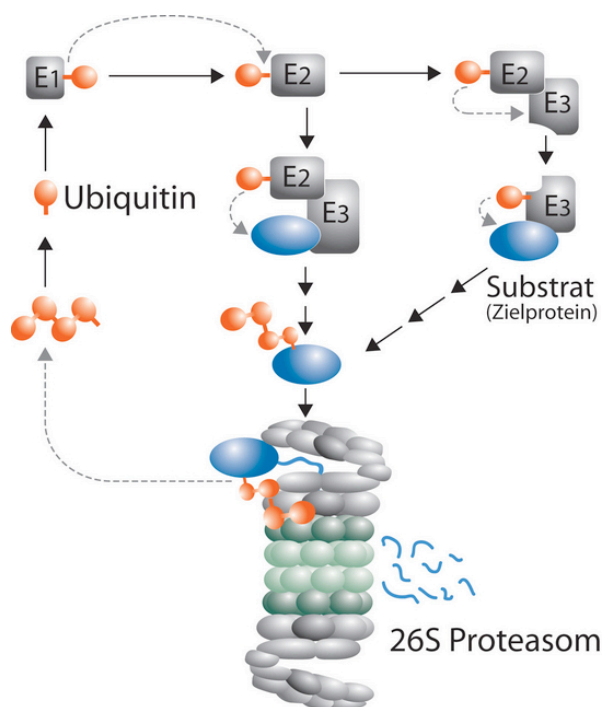


Figura 9 - Sistema de proteasoma/ubiquitina de Levedura. Figura extraída do Institute for Biochemistry, University of Stuttgart) acessível em: http://www.biopro.de/magazin/wissenschaft/archiv_2007/index.html?lang=en&artikelid=/artikel/02360/index.html, acesso: 2 de maio de 2014.⁷¹

2.5. Ubiquitina Ligase E3

As ligases de ubiquitina E3 são consideradas componentes centrais do complexo ERAD, principalmente por realizar uma ligação funcional entre o controle de qualidade da proteína no RE e o Sistema – Proteasoma/Ubiquitina (UPS-*Ubiquitin Proteasome System*)⁷². Duas principais ubiquitinas ligase associada a degradação do retículo endoplasmático em leveduras, Hrd1p/Der1p que corresponde as enzimas E3 das vias ERAD-M e ERAD-L e Doa10p da via ERAD-C têm sido descrito^{73; 74}. Estas enzimas E3 pertence à família de ligase do tipo *RING ligase* que possuem multidomínios transmembrânicos e que, em conjunto com as enzimas do tipo E2 Ubc6p e Ubc7p (Doa10p) e com Ubc1p e Ubc7p (Hrd1p), catalisam a ubiquitinação de diferentes substratos⁷⁵.

O complexo Hrd1, em especial, é formado por Hrd1p, Hrd3p, e Der1p em leveduras e, Hrd1, SEL1L, Derlin-1 em mamíferos. Hrd1 é uma proteína instável altamente conservada, contendo uma região N-terminal ancorada à membrana e uma região C-terminal solúvel, apresentando um domínio do tipo *Ring*,

responsável pela catálise de transferência de ubiquitina ao substrato⁷⁶. Já as proteínas Hrd3p ou SEL1L possuem domínio luminal, que está relacionado ao reconhecimento das proteínas mal enoveladas, juntamente com as chaperonas YOS-9p/Kar2 e OS-9/XTP3B, e uma pequena cauda citoplasmática. Além de realizar o reconhecimento de estruturas mal enoveladas, recentes estudos têm mostrado que, semelhantemente a Hrd3p⁷⁷, SEL1L é indispensável tanto para a estabilidade da proteína Hrd1 a longo prazo, quanto para o processo de Degradação Associada ao Retículo Endoplasmático (ERAD)⁷⁸, apesar de alguns estudos mostrarem que a expressão transiente dessa molécula não complexada com o Hrd1 resulta em sua rápida degradação pelo proteasoma⁷⁹.

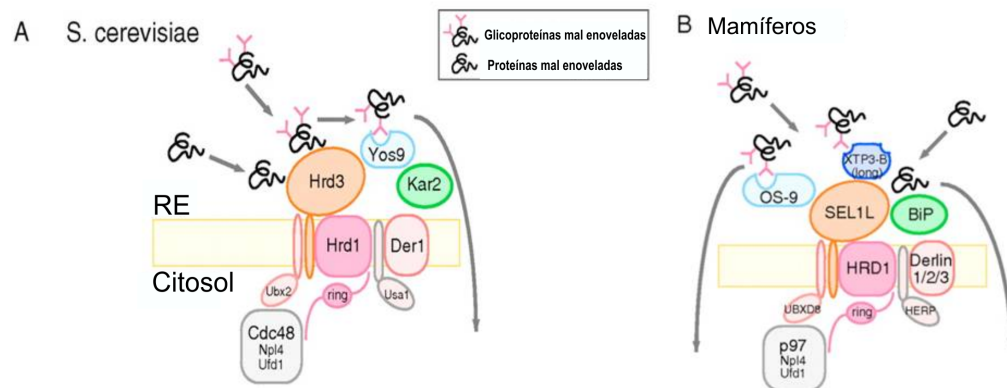


Figura 10- Representação esquemática do reconhecimento de proteínas mal enoveladas pelo complexo HRD1. Figura A: Complexo ubiquitina ligase E3 de *S. cerevisiae*. Hrd1-Hrd3 forma um complexo com outros componentes transmembrânicos do ERAD e está ligada ao complexo citosólico AAA ATPase Cdc48. No lúmen do RE, Yos9 e Kar2 associam-se com o complexo de ubiquitina-ligase através da ligação ao domínio luminal de Hrd3. A porção não enovelada é reconhecida por Hrd3. B: Complexo Ubiquitina-ligase de mamífero. OS-9 e XTP3-B são incorporados no complexo ubiquitina-ligase presente na membrana do RE através da interação com SEL1L. Figura retirada do artigo Hosokawa N et al. 2010⁶².

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de explorar o sistema de ERAD para promover a degradação de proteínas alvo. Em um estudo, pesquisadores mostraram a habilidade da proteína quimérica (fragmento de anticorpo fusionado a SEL1L), chamada de *degradin*, em degradar proteínas específicas da via secretória tanto secretadas quanto ligadas a membrana, através do processo de retrotranslocação e degradação pelo proteasoma⁸⁰. Em um trabalho posterior o mesmo grupo mostrou a potencialidade do sistema

degradina em reconhecer e degradar a gp160 do vírus HIV, reduzindo a sua infectividade⁷⁸.

Assim, o mecanismo da ERAD mostra a grande potencialidade biotecnológica em interferir no processo de infecção virais.

3. Aplicação biotecnológica contra o vírus da dengue

Diversas aplicações biotecnológicas têm sido desenvolvidas para combater o vírus da dengue, contudo, não há nenhuma medida terapêutica eficaz contra a infecção viral⁸¹. Entre as plataformas biotecnológicas, atualmente, aplicadas estão a produção de vacinas, produção de anticorpos neutralizantes e produção de mosquitos transgênicos.

3.2. Vacinas

Diversas estratégias de desenvolvimento de vacina têm sido propostas para o controle da dengue, entre elas estão as vias clássicas que envolvem o uso de vírus inativados ou atenuados, bem como as de nova geração que utiliza a imunização através das vacinas de DNA, proteínas recombinantes ou proteínas quiméricas ao vírus (Figura 11). Essas estratégias visam estimular a resposta imune para prevenir a infecção contra o vírus, através da produção de anticorpos neutralizantes.

Pela via clássica, a vacinação pelo uso de vírus atenuados, os pesquisadores utilizam vírus enfraquecidos para produzir uma resposta imune robusta similar a infecção natural, contudo sem desenvolver a doença ou os sintomas associado a dengue. As vacinas de vírus atenuados avançaram para fase clínica, porém mostraram problemas de imunogenicidade desigual contra os quatro sorotipos⁸². Já o uso de vírus inativados possui algumas vantagens sobre o vírus vivo, tal como, de não existir a possibilidade da reversão da virulência e a indução de uma resposta imune balanceada relativamente fácil contra os quatro sorotipos. Entretanto, desafios como a falta de imunidade contra as proteínas não estruturais e a existência de uma adjuvante que aumente a imunogenicidade do vírus dificulta a implementação desse tipo de vacina⁸².

A produção de vacinas de segunda geração teve o seu avanço, principalmente, com o desenvolvimento da biologia molecular para a produção de DNA recombinante.

Para essa técnica os pesquisadores têm produzido vírus quiméricos a partir da do uso do genoma do vírus da febre amarela linhagem 17D (YFV 17D).

subunidades proteicas ou proteínas quiméricas, pesquisadores produzem, mais comumente, subunidade do vírus por sistema de expressão heteróloga em organismos procarioto ou eucarito⁸³. Já a técnica de vacina de DNA utiliza um vetor de expressão para a produção da proteína viral diretamente na célula do hospedeiro. A vantagem dessa metodologia em relação a proteína quimérica seria o enovelamento apropriado e as corretas modificações pós traducionais, como a adição de N-glicosilação, importante para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora⁸⁴. Contudo, devido as problemáticas da sub-neutralização e consequentes infecções secundárias, que podem gerar a dengue hemorrágica, pesquisas têm concentrado seus esforços em busca de vacinas tetravalentes⁸¹.

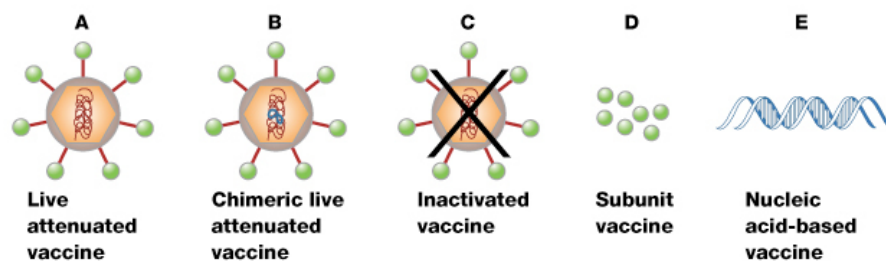


Figure 11 - Representação dos tipos de vacina. A-vírus atenuados, B-proteína quimérica; C-vírus inativado, D-subunidade de proteína recombinante; E-vacina de DNA. Figura retirada do site Nature Education. Acessível: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/future-dengue-fever-treatments-22404960>. Acesso: 21 de maio de 2014.⁸⁵

3.3. Drogas antivirais

Uma alternativa para vacinação é o desenvolvimento de drogas antivirais. Apesar de ser uma área recente na pesquisa, os cientistas acreditam que essas drogas poderiam ser administradas a pessoas com ou sem febre a fim de diminuir ou evitar os sintomas da infecção. Antivirais devem ser administrados a partir do primeiro sinal de um surto de dengue diminuindo o risco da progressão da

doença. Ribavirina, ácido micofenólico⁸⁶, e análogos de adenosina⁸⁷, são alguns antivirais que podem atuar como agentes inibidores da polimerase dependente de RNA⁸⁷, no entanto, devido à baixa eficiência e alta toxicidade desses componentes, inibidores potentes ainda são necessários⁸⁸.

3.4. Anticorpos Monoclonal Neutralizantes

Outra via de inibição do vírus é através da produção de anticorpos neutralizantes. Atualmente o método convencional de produção de anticorpos é através do procedimento de hibridoma. Por essa metodologia, ocorre a imunização do camundongo com o antígeno de interesse, seguido pela fusão de células do baço do animal, a qual produz o anticorpo, com células cancerígenas imortalizadas. Além disso, os hibridomas podem ser injetados dentro do abdômen de outro camundongo (método de ascite) ou cultivados em biorreatores para a produção em larga escala⁸⁹. A tecnologia de Anticorpos Recombinantes, contudo, têm sido uma poderosa alternativa a técnica convencional que permite selecionar anticorpos de alta afinidade a alvos específicos.

Phage display é uma metodologia baseada na expressão de polipeptídeos fusionadas a proteína de capsídeo do bacteriófago, mediante a inserção de um DNA recombinante⁹⁰. Essa técnica tem sido considerada uma ferramenta poderosa, uma vez que tem influenciado diversas áreas da ciência como: a descoberta e designer de drogas⁹¹, o mapeamento de superfícies celular⁹², vacinas⁹³, desenvolvimento de ligantes a superfície celular com potencial aplicação na entrega de drogas⁹⁴, biomarcadores⁹⁵ e produção de fragmentos de anticorpos (scFv - *single chain fragment variable* ou Fab - *fragment of antibody*) neutralizantes de alvos específicos (bactéria⁹⁶, vírus⁹⁷, citocinas⁹⁸ etc).

Em relação a produção de anticorpos recombinantes, essa metodologia, permite isolar fragmentos de alta afinidade diretamente a partir de um repertório de genes, sem a necessidade da via clássica, dependente do sistema imune do animal⁹⁹. Além disso, a técnica pode ser aplicada a uma ampla variedade de antígenos, incluindo alvos não imunogênicos, como por exemplo moléculas de RNA¹⁰⁰, superfície celular ou antígenos tóxicos^{101; 102; 103; 104}.

A vantagem de utilizar a metodologia de *Phage display* é a facilidade e a

rapidez de seleção, análise e produção, além de possibilitar um maior controle experimental, quando comparado ao anticorpos produzidos por imunização e reformulação do fragmento de anticorpo através de uma simples etapa de subclonagem. Essa reformulação baseia-se na produção de dímeros ou multímeros, melhorando a afinidade do anticorpo, na fusão do anticorpo a enzimas, marcadores ou proteínas fluorescentes. Assim, a ligação de scFv ou Fab à enzimas¹⁰⁵, proteínas apoptóticas¹⁰⁶, citocinas^{107; 108}, ou RNases¹⁰⁹ tem permitido a reformulação de novos paradigmas de diagnósticos e terapêuticas.

A biblioteca de anticorpos de *Phage Display* têm, também, sido amplamente aplicadas para selecionar fragmentos ligantes a agentes infecciosos. Muitos trabalhos têm mostrado a produção de scFv capazes de discriminar diferentes linhagens de hantavirus^{110; 111}, vírus da dengue¹¹², influenza¹¹³, Ebola¹¹⁴, vírus da Encefalite¹¹⁵ entre outros, com potencial terapêutico.

Além do uso de diagnóstico para a detecção viral através da técnica de produção de anticorpos recombinantes, muitos estudos têm mostrado a efetividade de moléculas de scFv ou Fab em neutralizar a infecção viral ou inibir a sua replicação através da neutralização de epítomos importantes de interação com o receptor ou proteínas de fusão¹¹⁶, pelo impedimento de oligodimerização do capsídeo ou envelope viral¹¹⁷ ou por inibição de proteínas não estruturais importantes para a replicação do vírus¹¹³.

3.5. Biotecnologia aplicada a vetores

A transmissão do vírus da dengue é feito pelo mosquito *Aedes aegypti*¹¹⁸. A fêmea do *A. aegypti* é um importante vetor pois, além de se alimentar de sangue de animais de sangue quente, está bem adaptado ao ambiente urbano tropical¹¹⁹.

Atualmente, o controle das doenças infecciosas transmitidas por insetos é feito através do uso de inseticidas ou controle do vetor. No entanto, apesar de muitos esforços, a rápida urbanização, a falta de uma boa condição sanitária, o uso indiscriminado de inseticidas selecionando insetos resistentes, têm ajudado na proliferação do vetor e disseminação da doença^{120; 121}. Assim, novas estratégia de controles são necessárias.

Outra estratégia possível consiste em substituir vetores competentes em transmitir o vírus da dengue por vetores não competentes. Com advento das pesquisas genômicas e pós-genômicas o desenvolvimento de novas ferramentas para eliminar a infecção do patógeno no artrópode ou bloquear sua transmissão tem produzido dados significantes. Nesta ferramenta inclui novas manipulação genética para anular a habilidade do patógeno em infectar o vetor que transmite a doença ou na habilidade de inibir replicação viral ^{121; 122}.

Franz et al 2006 ¹²² desenvolveram mosquito transgênico capaz de produzir RNA de interferência contra proteínas do envelope do vírus da dengue tipo 2. Em sua pesquisa, ele demonstrou que os mosquitos transgênicos são menos susceptíveis a infecção e menos permissíveis a replicação viral. Em outra metodologia Kokoza et al 2010¹²³ relataram a construção de *A. aegypti* transgênico capaz de produzir peptídeos antimicrobianos com a Cecoprina A e Defensina, que são capazes de bloquear a transmissão de *Plasmodium gallinaceum*¹²³.

O desenvolvimento da técnica de liberação de insetos carregando um domínio letal - RIDL (*Release of Insect Dominant Lethal*), também, tem sido aplicado como outra forma de diminuir a transmissão da doença. Essa técnica baseia-se em na estratégia de controle genético derivado da técnica clássica de Inseto Estéril (SIT- *Sterile Insect Technique*). Basicamente, o mosquito transgênico carrega um sistema genético dominante, repressora, não específico ao sexo de ação tardia de fase específica. Neste sistema, na ausência de tetraciclina a larva se desenvolve normalmente, entretanto, morre durante o desenvolvimento em pupa. Porém se criados na presença de tetraciclina o gene letal é reprimido, já que, este antibiótico atua como um "antídoto" ou repressor do sistema letal. A proposta desta estratégia é liberar os machos transgênicos, os quais são homozigotos para o gene letal, e este ao passar uma cópia do gene letal dominante para as suas prole, por herança mendeliana, as pupas não sobreviveriam em uma ambiente natural devido à ausência da tetraciclina ^{124; 125}.

Objetivo Geral

Desenvolver uma abordagem biotecnológica contra a dengue através da seleção e produção de anticorpos por *Phage Display* contra as proteínas E e NS1 do vírus da dengue.

Fusionar o anticorpos selecionada a molécula de SEL1L para criar um sistema de degradação da proteína E e NS1 do vírus da dengue.

Objetivos específicos:

Selecionar por Phage Display anticorpos contra as proteínas E e NS1 do vírus da dengue tipo 1.

Subclonar os fragmentos de anticorpos no vetor de expressão em células de mamíferos.

Realizar o teste de inibição da formação de novas partículas virais e quantificar por qPCR.

Fusionar os fragmentos de scFv com a molécula de SEL1L e verificar a degradação das proteínas virais E e NS1.

Referências

- ¹ WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. May 1, 2014
ISSN 978 92 4 154787 1. Disponível em: < <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf?ua=1> >.
- ² GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. **Trop Med Health**, p. 3-11, Dec 2011. ISSN 1349-4147 (Electronic)
1348-8945 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500131> >.
Acesso em: 4 Suppl.
- ³ SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **N Engl J Med**, v. 366, n. 15, p. 1423-32, Apr 12 2012.
ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494122> >.
- ⁴ SHEPARD, D. S. et al. Economic impact of dengue illness in the Americas. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, n. 2, p. 200-7, Feb 2011. ISSN 1476-1645 (Electronic)
0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292885> >.
- ⁵ MURRAY, N. E.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clin Epidemiol**, v. 5, p. 299-309, 2013. ISSN 1179-1349 (Electronic)
1179-1349 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990732> >.
- ⁶ WHO. Dengue. 2013. Disponível em: < http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png >. Acesso em: 18 de June.
- ⁷ (PAHO)., P. A. H. O. Dados da dengue no Brasil, 2013. Accessed May 2014. Disponível em: < http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3159&Itemid=1 >.
- ⁸ COELHO, G. **Country Updates on Dengue**. Cooperation among early adopter countries for Dengue Vaccines. Bangkok, Thailand. October 24 – 25, 2013. p.
- ⁹ VILLORDO, S. M.; ALVAREZ, D. E.; GAMARNIK, A. V. A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication. **RNA**, v. 16, n. 12, p. 2325-35, Dec 2010. ISSN 1469-9001 (Electronic)
1355-8382 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980673> >.
- ¹⁰ GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, Dec 2010. ISSN 1740-1534 (Electronic)
1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079655> >.

- 11 CRILL, W. D.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **Journal of virology**, v. 75, n. 16, p. 7769-73, Aug 2001. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11462053> >.
- 12 HUANG, C. Y. et al. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. **Virology**, v. 396, n. 2, p. 305-15, Jan 20 2010. ISSN 1096-0341 (Electronic) 0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913272> >.
- 13 PIERSON, T. C. et al. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. **Cell Host Microbe**, v. 4, n. 3, p. 229-38, Sep 11 2008. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779049> >.
- 14 MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-9, Jan 22 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14737159> >.
- 15 EDUCATION, N., Disponível em: < <http://www.nature.com/scitable/ebooks/dengue-fever-22453392/118246843> >. Acesso em: 2 de maio.
- 16 KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-25, Mar 8 2002. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893341> >.
- 17 MA, L. et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3414-9, Mar 9 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993605> >.
- 18 ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Functional entry of dengue virus into Aedes albopictus mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **J Gen Virol**, v. 89, n. Pt 2, p. 474-84, Feb 2008. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18198378> >.
- 19 MILLER, J. L. et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. e17, Feb 8 2008. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18266465> >.
- 20 DUAN, X. et al. Novel binding between pre-membrane protein and vacuolar ATPase is required for efficient dengue virus secretion. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 373, n. 2, p. 319-24, Aug 22 2008. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573235> >.
- 21 KIELIAN, M.; REY, F. A. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 1, p. 67-76, Jan 2006. ISSN 1740-1526 (Print)

- 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357862> >.
- ²² FISCHL, W.; BARTENSCHLAGER, R. Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 4, p. 470-5, Aug 2011. ISSN 1879-0364 (Electronic)
1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798792> >.
- ²³ MILLER, S. et al. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8873-82, Mar 23 2007. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276984> >.
- ²⁴ ROOSENDAAAL, J. et al. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. **Journal of virology**, v. 80, n. 9, p. 4623-32, May 2006. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611922> >.
- ²⁵ WELSCH, S. et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 4, p. 365-75, Apr 23 2009. ISSN 1934-6069 (Electronic)
1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380115> >.
- ²⁶ YAP, T. L. et al. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. **Journal of virology**, v. 81, n. 9, p. 4753-65, May 2007. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17301146> >.
- ²⁷ ZHANG, Y.; KOSTYUCHENKO, V. A.; ROSSMANN, M. G. Structural analysis of viral nucleocapsids by subtraction of partial projections. **Journal of structural biology**, v. 157, n. 2, p. 356-64, Feb 2007. ISSN 1047-8477 (Print)
1047-8477 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17064936> >.
- ²⁸ IGLESIAS, N. G.; GAMARNIK, A. V. Dynamic RNA structures in the dengue virus genome. **RNA Biol**, v. 8, n. 2, p. 249-57, Mar-Apr 2011. ISSN 1555-8584 (Electronic)
1547-6286 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593583> >.
- ²⁹ GEBHARD, L. G.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1739-56, Sep 2011. ISSN 1999-4915 (Electronic)
1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994804> >.
- ³⁰ ELSHUBER, S.; MANDL, C. W. Resuscitating mutations in a furin cleavage-deficient mutant of the flavivirus tick-borne encephalitis virus. **J Virol**, v. 79, n. 18, p. 11813-23, Sep 2005. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16140758> >.

- ³¹ ZHANG, Y. et al. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO journal**, v. 22, n. 11, p. 2604-13, Jun 2 2003. ISSN 0261-4189 (Print)
0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773377> >.
- ³² GUTSCHE, I. et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 19, p. 8003-8, May 10 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518917> >.
- ³³ LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **J Virol**, v. 73, n. 6, p. 4611-21, Jun 1999. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10233920> >.
- ³⁴ SATCHIDANANDAM, V.; UCHIL, P. D.; KUMAR, P. Organization of flaviviral replicase proteins in virus-induced membranes: a role for NS1' in Japanese encephalitis virus RNA synthesis. **Novartis Found Symp**, v. 277, p. 136-45; discussion 145-8, 251-3, 2006. ISSN 1528-2511 (Print)
1528-2511 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319159> >.
- ³⁵ AVIRUTNAN, P. et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis**, v. 193, n. 8, p. 1078-88, Apr 15 2006. ISSN 0022-1899 (Print)
0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16544248> >.
- ³⁶ ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 376-81, Feb 2002. ISSN 0095-1137 (Print)
0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825945> >.
- ³⁷ EDGIL, D.; POLACEK, C.; HARRIS, E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. **J Virol**, v. 80, n. 6, p. 2976-86, Mar 2006. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501107> >.
- ³⁸ GROSS, J. D. et al. Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. **Cell**, v. 115, n. 6, p. 739-50, Dec 12 2003. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14675538> >.
- ³⁹ KRAB, I. M. et al. Coat protein enhances translational efficiency of Alfalfa mosaic virus RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4F. **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 6, p. 1841-9, Jun 2005. ISSN 0022-1317 (Print)
0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15914864> >.
- ⁴⁰ NAGY, P. D.; POGANY, J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 137-49, Feb 2012. ISSN 1740-1534 (Electronic)

- 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22183253> >.
- ⁴¹ UMAREDDY, I. et al. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. **Virology**, v. 4, p. 91, 2007. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17888185> >.
- ⁴² YU, I. M. et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1834-7, Mar 28 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369148> >.
- ⁴³ ZHENG, A.; UMASHANKAR, M.; KIELIAN, M. In vitro and in vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001157, 2010. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975939> >.
- ⁴⁴ STEPHENS, S. B.; NICCHITTA, C. V. Divergent regulation of protein synthesis in the cytosol and endoplasmic reticulum compartments of mammalian cells. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. 2, p. 623-32, Feb 2008. ISSN 1939-4586 (Electronic) 1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077556> >.
- ⁴⁵ HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 2, p. 89-102, Feb 2012. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22251901> >.
- ⁴⁶ ZIMMERMANN, R. et al. Protein translocation across the ER membrane. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, n. 3, p. 912-24, Mar 2011. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599535> >.
- ⁴⁷ GUERRIERO, C. J.; BRODSKY, J. L. The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. **Physiol Rev**, v. 92, n. 2, p. 537-76, Apr 2012. ISSN 1522-1210 (Electronic) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22535891> >.
- ⁴⁸ ELLGAARD, L.; HELENIUS, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 3, p. 181-91, Mar 2003. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612637> >.
- ⁴⁹ TSAI, Y. C.; WEISSMAN, A. M. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. **Genes Cancer**, v. 1, n. 7, p. 764-778, Jul 1 2010. ISSN 1947-6019 (Print) 1947-6019 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331300> >.
- ⁵⁰ VEMBAR, S. S.; BRODSKY, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 12, p. 944-57, Dec 2008. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002207> >.

- 51 MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 7, p. 448-62, Jul 2012. ISSN 1471-0080 (Electronic)
1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722607> >.
- 52 VASHIST, S.; NG, D. T. Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. **J Cell Biol**, v. 165, n. 1, p. 41-52, Apr 2004. ISSN 0021-9525 (Print)
0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078901> >.
- 53 CARVALHO, P.; GODER, V.; RAPOPORT, T. A. Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. **Cell**, v. 126, n. 2, p. 361-73, Jul 28 2006. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16873066> >.
- 54 RUGGIANO, A.; FORESTI, O.; CARVALHO, P. Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. **J Cell Biol**, v. 204, n. 6, p. 869-79, Mar 17 2014. ISSN 1540-8140 (Electronic)
0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637321> >.
- 55 KNOP, M.; HAUSER, N.; WOLF, D. H. N-Glycosylation affects endoplasmic reticulum degradation of a mutated derivative of carboxypeptidase yscY in yeast. **Yeast**, v. 12, n. 12, p. 1229-38, Sep 30 1996. ISSN 0749-503X (Print)
0749-503X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8905927> >.
- 56 HAMMOND, C.; BRAAKMAN, I.; HELENIUS, A. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 3, p. 913-7, Feb 1 1994. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8302866> >.
- 57 OLZMANN, J. A.; KOPITO, R. R.; CHRISTIANSON, J. C. The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 9, Sep 2013. ISSN 1943-0264 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23232094> >.
- 58 RUTKEVICH, L. A.; WILLIAMS, D. B. Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 2, p. 157-66, Apr 2011. ISSN 1879-0410 (Electronic)
0955-0674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094034> >.
- 59 HELENIUS, A.; AEBI, M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. **Annu Rev Biochem**, v. 73, p. 1019-49, 2004. ISSN 0066-4154 (Print)
0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189166> >.
- 60 LEDERKREMER, G. Z. Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. **Curr Opin Struct Biol**, v. 19, n. 5, p. 515-23, Oct 2009. ISSN 1879-033X (Electronic)
0959-440X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616933> >.

- ⁶¹ CLERC, S. et al. Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. **J Cell Biol**, v. 184, n. 1, p. 159-72, Jan 12 2009. ISSN 1540-8140 (Electronic)
0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124653> >.
- ⁶² HOSOKAWA, N.; KAMIYA, Y.; KATO, K. The role of MRH domain-containing lectins in ERAD. **Glycobiology**, v. 20, n. 6, p. 651-60, Jun 2010. ISSN 1460-2423 (Electronic)
0959-6658 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20118070> >.
- ⁶³ SATOH, T. et al. Structural basis for oligosaccharide recognition of misfolded glycoproteins by OS-9 in ER-associated degradation. **Mol Cell**, v. 40, n. 6, p. 905-16, Dec 22 2010. ISSN 1097-4164 (Electronic)
1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21172656> >.
- ⁶⁴ SHIMIZU, Y.; OKUDA-SHIMIZU, Y.; HENDERSHOT, L. M. Ubiquitylation of an ERAD substrate occurs on multiple types of amino acids. **Mol Cell**, v. 40, n. 6, p. 917-26, Dec 22 2010. ISSN 1097-4164 (Electronic)
1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21172657> >.
- ⁶⁵ GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological reviews**, v. 82, n. 2, p. 373-428, Apr 2002. ISSN 0031-9333 (Print)
0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11917093> >.
- ⁶⁶ PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annual review of biochemistry**, v. 70, p. 503-33, 2001. ISSN 0066-4154 (Print)
0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395416> >.
- ⁶⁷ YE, Y.; MEYER, H. H.; RAPOPORT, T. A. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. **Nature**, v. 414, n. 6864, p. 652-6, Dec 6 2001. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11740563> >.
- ⁶⁸ _____. Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. **J Cell Biol**, v. 162, n. 1, p. 71-84, Jul 7 2003. ISSN 0021-9525 (Print)
0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847084> >.
- ⁶⁹ JAROSCH, E. et al. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 2, p. 134-9, Feb 2002. ISSN 1465-7392 (Print)
1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11813000> >.
- ⁷⁰ RABINOVICH, E. et al. AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 2, p. 626-34, Jan 2002. ISSN 0270-7306 (Print)
0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756557> >.

- ⁷¹ INSTITUTE FOR BIOCHEMISTRY, U. O. S., Disponível em: < http://www.biopro.de/magazin/wissenschaft/archiv_2007/index.html?lang=en&artikeld=/artikel/02360/index.html >. Acesso em: 2 may.
- ⁷² GODER, V. Roles of ubiquitin in endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD). **Curr Protein Pept Sci**, v. 13, n. 5, p. 425-35, Aug 2012. ISSN 1875-5550 (Electronic)
1389-2037 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22812526> >.
- ⁷³ BAYS, N. W. et al. Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. **Nature cell biology**, v. 3, n. 1, p. 24-9, Jan 2001. ISSN 1465-7392 (Print)
1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146622> >.
- ⁷⁴ CHEN, P. et al. Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. **Cell**, v. 74, n. 2, p. 357-69, Jul 30 1993. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8393731> >.
- ⁷⁵ KOSTOVA, Z.; TSAI, Y. C.; WEISSMAN, A. M. Ubiquitin ligases, critical mediators of endoplasmic reticulum-associated degradation. **Semin Cell Dev Biol**, v. 18, n. 6, p. 770-9, Dec 2007. ISSN 1084-9521 (Print)
1084-9521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950636> >.
- ⁷⁶ SATO, B. K. et al. Misfolded membrane proteins are specifically recognized by the transmembrane domain of the Hrd1p ubiquitin ligase. **Mol Cell**, v. 34, n. 2, p. 212-22, Apr 24 2009. ISSN 1097-4164 (Electronic)
1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19394298> >.
- ⁷⁷ GARDNER, R. G. et al. Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. **J Cell Biol**, v. 151, n. 1, p. 69-82, Oct 2 2000. ISSN 0021-9525 (Print)
0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018054> >.
- ⁷⁸ CASINI A, O. M., BURRONE O, CERESETO A. **Reduction of HIV-1 infectivity by exploiting the cellular ERAD machinery**. *Retrovirology*. Cambridge, UK: p11 p. 2013.
- ⁷⁹ IIDA, Y. et al. 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**, v. 286, n. 19, p. 16929-39, May 13 2011. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454652> >.
- ⁸⁰ VECCHI, L. et al. Selective targeting of proteins within secretory pathway for endoplasmic reticulum-associated degradation. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 24, p. 20007-15, Jun 8 2012. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22523070> >.

- 81 DEL ANGEL, R. M.; REYES-DEL VALLE, J. Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003551, 2013. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24098108> >.
- 82 WAN, S. W. et al. Current progress in dengue vaccines. **J Biomed Sci**, v. 20, p. 37, 2013. ISSN 1423-0127 (Electronic) 1021-7770 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23758699> >.
- 83 VALDES, I. et al. The chimeric protein domain III-capsid of dengue virus serotype 2 (DEN-2) successfully boosts neutralizing antibodies generated in monkeys upon infection with DEN-2. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 3, p. 455-9, Mar 2011. ISSN 1556-679X (Electronic) 1556-679X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21209159> >.
- 84 AZEVEDO, A. S. et al. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e20528, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779317> >.
- 85 EDUCATION, N. Dengue virus: Vaccine. Disponível em: < <http://www.nature.com/scitable/topicpage/future-dengue-fever-treatments-22404960> >. Acesso em: 21 of may 2014.
- 86 TAKHAMPUNYA, R. et al. Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. **J Gen Virol**, v. 87, n. Pt 7, p. 1947-52, Jul 2006. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760396> >.
- 87 CHEN, Y. L. et al. Inhibition of dengue virus by an ester prodrug of an adenosine analog. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 8, p. 3255-61, Aug 2010. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516277> >.
- 88 ALLEN, M. M.; SCHOLS, D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. **J Trop Med**, v. 2012, p. 628475, 2012. ISSN 1687-9694 (Electronic) 1687-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22529868> >.
- 89 LERNER, E. A. How to make a hybridoma. **Yale J Biol Med**, v. 54, n. 5, p. 387-402, Sep-Oct 1981. ISSN 0044-0086 (Print) 0044-0086 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7039149> >.
- 90 SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-7, Jun 14 1985. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4001944> >.
- 91 HETIAN, L. et al. A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to

- its kinase domain receptor. **J Biol Chem**, v. 277, n. 45, p. 43137-42, Nov 8 2002. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183450> >.
- ⁹² ROWLEY, M. J.; O'CONNOR, K.; WIJEYEWICKREMA, L. Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. **Biotechnol Annu Rev**, v. 10, p. 151-88, 2004. ISSN 1387-2656 (Print)
1387-2656 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504706> >.
- ⁹³ DE BERARDINIS, P.; HAIGWOOD, N. L. New recombinant vaccines based on the use of prokaryotic antigen-display systems. **Expert Rev Vaccines**, v. 3, n. 6, p. 673-9, Dec 2004. ISSN 1744-8395 (Electronic)
1476-0584 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15606352> >.
- ⁹⁴ SERGEEVA, A. et al. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 58, n. 15, p. 1622-54, Dec 30 2006. ISSN 0169-409X (Print)
0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123658> >.
- ⁹⁵ GOULART, L. R. et al. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. **Crit Rev Immunol**, v. 30, n. 2, p. 201-22, 2010. ISSN 1040-8401 (Print)
1040-8401 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370630> >.
- ⁹⁶ HUSSACK, G. et al. Neutralization of Clostridium difficile toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding domain. **J Biol Chem**, v. 286, n. 11, p. 8961-76, Mar 18 2011. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216961> >.
- ⁹⁷ WANG, Y. et al. Affinity maturation to improve human monoclonal antibody neutralization potency and breadth against hepatitis C virus. **J Biol Chem**, v. 286, n. 51, p. 44218-33, Dec 23 2011. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22002064> >.
- ⁹⁸ LI, T. et al. A neutralization scFv antibody against IL-1beta isolated from a NIPA-based bacterial display library. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 14, n. 6, p. 571-81, Jul 2013. ISSN 1873-4316 (Electronic)
1389-2010 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24016270> >.
- ⁹⁹ HOOGENDOORN, H. R. Overview of antibody phage-display technology and its applications. **Methods Mol Biol**, v. 178, p. 1-37, 2002. ISSN 1064-3745 (Print)
1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11968478> >.
- ¹⁰⁰ YE, J. D. et al. Synthetic antibodies for specific recognition and crystallization of structured RNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 1, p. 82-7, Jan 8 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162543> >.

- 101 BUGLI, F. et al. Monoclonal antibody fragment from combinatorial phage display library neutralizes alpha-latrotoxin activity and abolishes black widow spider venom lethality, in mice. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 547-54, Mar 15 2008. ISSN 0041-0101 (Print)
0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187177> >.
- 102 GRIFFITHS, A. D. et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. **EMBO J**, v. 13, n. 14, p. 3245-60, Jul 15 1994. ISSN 0261-4189 (Print)
0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8045255> >.
- 103 WINTER, G. et al. Making antibodies by phage display technology. **Annu Rev Immunol**, v. 12, p. 433-55, 1994. ISSN 0732-0582 (Print)
0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8011287> >.
- 104 BRADBURY, A. R. et al. Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. **Nat Biotechnol**, v. 29, n. 3, p. 245-54, Mar 2011. ISSN 1546-1696 (Electronic)
1087-0156 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21390033> >.
- 105 OYAMA, H. et al. Anti-idiotypic scFv-enzyme fusion proteins: a clonable analyte-mimicking probe for standardized immunoassays targeting small biomarkers. **Anal Chem**, v. 85, n. 23, p. 11553-9, Dec 3 2013. ISSN 1520-6882 (Electronic)
0003-2700 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24256209> >.
- 106 EL-MESERY, M. et al. CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e916, 2013. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24232092> >.
- 107 XIANG, J. Targeting cytokines to tumors to induce active antitumor immune responses by recombinant fusion proteins. **Hum Antibodies**, v. 9, n. 1, p. 23-36, 1999. ISSN 1093-2607 (Print)
1093-2607 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331183> >.
- 108 JAHN, T. et al. An IL12-IL2-antibody fusion protein targeting Hodgkin's lymphoma cells potentiates activation of NK and T cells for an anti-tumor attack. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44482, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23028547> >.
- 109 MENZEL, C. et al. Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas. **Blood**, v. 111, n. 7, p. 3830-7, Apr 1 2008. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18230757> >.
- 110 VELAPPAN, N. et al. Selection and characterization of scFv antibodies against the Sin Nombre hantavirus nucleocapsid protein. **J Immunol Methods**, v. 321, n. 1-2, p. 60-9, Apr 10 2007. ISSN 0022-1759 (Print)
0022-1759 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17336997> >.

- 111 YANG, J. et al. Production and characterization of a recombinant single-chain antibody against Hantaan virus envelop glycoprotein. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 86, n. 4, p. 1067-75, Apr 2010. ISSN 1432-0614 (Electronic)
0175-7598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012277> >.
- 112 SAOKAEW, N. et al. Human monoclonal single-chain antibodies specific to dengue virus envelope protein. **Lett Appl Microbiol**, v. 58, n. 3, p. 270-7, Mar 2014. ISSN 1472-765X (Electronic)
0266-8254 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24266517> >.
- 113 YODSHEEWAN, R. et al. Human monoclonal ScFv specific to NS1 protein inhibits replication of influenza viruses across types and subtypes. **Antiviral Res**, v. 100, n. 1, p. 226-37, Oct 2013. ISSN 1872-9096 (Electronic)
0166-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23928258> >.
- 114 TIKUNOVA, N. V.; BATANOVA, T. A.; CHEPURNOV, A. A. [Human recombinant antibodies to Ebola virus: preparation and characteristics]. **Vopr Virusol**, v. 50, n. 5, p. 25-9, Sep-Oct 2005. ISSN 0507-4088 (Print)
0507-4088 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16250595> >.
- 115 LEVANOV, L. N. et al. Chimeric antibodies against tick-borne encephalitis virus. **Vaccine**, v. 28, n. 32, p. 5265-71, Jul 19 2010. ISSN 1873-2518 (Electronic)
0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538092> >.
- 116 MINAEIAN, S. et al. Neutralization of human papillomavirus by specific nanobodies against major capsid protein L1. **J Microbiol Biotechnol**, v. 22, n. 5, p. 721-8, May 2012. ISSN 1738-8872 (Electronic)
1017-7825 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561868> >.
- 117 VERCROYSE, T. et al. An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal alpha-helical multimerization domain of HIV-1 rev prevents viral production. **J Biol Chem**, v. 285, n. 28, p. 21768-80, Jul 9 2010. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406803> >.
- 118 GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of medical research**, v. 33, n. 4, p. 330-42, Jul-Aug 2002. ISSN 0188-4409 (Print)
0188-4409 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234522> >.
- 119 HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why do female Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 3, p. 411-22, May 2001. ISSN 0022-2585 (Print)
0022-2585 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11372967> >.
- 120 FU, G. et al. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 10, p. 4550-4, Mar 9 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176967> >.

¹²¹ SPERANCA, M. A.; CAPURRO, M. L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era--a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 425-33, Jun 2007. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612761> >.

¹²² FRANZ, A. W. et al. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 11, p. 4198-203, Mar 14 2006. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537508> >.

¹²³ KOKOZA, V. et al. Blocking of Plasmodium transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 18, p. 8111-6, May 4 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385844> >.

¹²⁴ BARGIELOWSKI, I. et al. Comparison of life history characteristics of the genetically modified OX513A line and a wild type strain of *Aedes aegypti*. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e20699, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21698096> >.

¹²⁵ MASSONNET-BRUNEEL, B. et al. Fitness of transgenic mosquito *Aedes aegypti* males carrying a dominant lethal genetic system. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e62711, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23690948> >.