

Adara Áurea dos Santos

**DINÂMICA DE RESPOSTA CELULAR AO IFN β FRENTE AO
ESPALHAMENTO VIRAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Santos Mansur

Santa Catarina

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Adara Áurea dos
DINÂMICA DE RESPOSTA CELULAR AO IFN? FRENTE AO
ESPALHAMENTO VIRAL / Adara Áurea dos Santos ;
orientador, Daniel Santos Mansur, 2018.

125 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

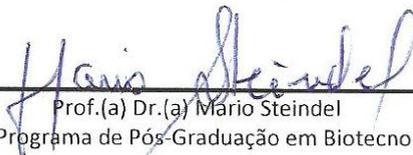
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Interferon.
3. Imunidade Inata contra vírus. 4. Espalhamento
viral. 5. Comunicação celular. I. Mansur, Daniel
Santos . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
e Biociências. III. Título.

“Dinâmica de resposta celular ao IFN β frente ao espalhamento viral”

Por

Adara Áurea dos Santos

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (003/2018/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof.(a) Dr.(a) Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr.(a) Daniel Santos Mansur (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Bruno Eduardo Fernandes Mota (Universidade Federal de Minas Gerais)



Dr.(a) Luciane Maria Perazzolo (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Patrícia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 28 de março de 2018.

Dedico este trabalho a todos os mestres
que participaram da minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Daniel Mansur, meu orientador, por acreditar no meu potencial, por mostrar que o mundo pode ser um pouco mais colorido, por se emporlar a cada resultado, por seus ensinamentos e amizade.

Ao prof. André Báfica, por mostrar que a ciência não se faz apenas pela execução de protocolos, pelas suas críticas e questionamentos.

Ao Laboratório de Imunobiologia, pela amizade, ensinamentos de bancada e fora dela, por serem um referencial de pesquisadores, aos debates dentro e fora do laboratório, pelas longas conversas, ao estímulo a pesquisa, protocolos, cafés, saideiras, risadas, trabalhos, enfim, por tudo. Em especial aos alunos Daniel Patrício, Paula Fernandes, Constanza Espada, Edgar Kozlova, Greicy Malaquias e Zamira Gerra por terem participado como colaboradores neste trabalho.

As alunas Karin dos Santos e Jéssica Copetti, que foram minhas alunas de iniciação científica. Talvez eu tenha aprendido mais do que ensinado.

A Mariana Maraschin pela amizade por ter permitido que eu participasse de sua aprendizagem.

Ao Laboratório de Protozoologia, em especial aos professores Mário Steindel, Edmundo Carlos Grisard e Patrícia Hermes Stoco pelos empréstimos de equipamentos e reagentes e aos alunos Abadio e Carime.

Aos doutores Juliano Bordignon e Guilherme Silveira pelo auxílio nos experimentos realizados no Instituto Carlos Chagas, Curitiba-PR.

Aos doutores Gustavo Menezes e Maísa Antunes pelos experimentos de confocal realizados no Centro de Biologia Gastrointestinal da Universidade Federal de Minas Gerais.

As agências de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais, de sangue e de coração, que me deram a vida, amor, carinho, educação, ensinaram-me o respeito para com as outras pessoas e acima de tudo, acreditaram em mim, obrigado! A minha família pelo carinho, principalmente a Tânia pelo apoio de todos os pontos possíveis, ao meu tio Tom e a minha vó Iolanda, e em especial ao Fabiano, obrigado!

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma”

John Kuskin

RESUMO

Durante uma infecção viral, as células são capazes de identificar padrões microbianos associado a patógenos e ativar uma resposta mediada por Interferons do tipo 1 (IFN-I). Esses IFNs podem agir de forma parácrina e autócrina e são responsáveis por induzir um estado antiviral. Contudo, dentro de uma população de células geneticamente idênticas, observa-se uma diversidade fenotípica, relacionada aos eventos probabilísticos de controle da expressão genica e proteica. Interessantemente, em uma dada população, as células que produzem IFN-I são também as que apresentam uma maior produção de proteínas virais. Dessa forma, a hipótese do trabalho é que o espalhamento viral é regulado temporalmente pela atividade parácrina dos IFNs-I produzidos pelas células da periferia da placa de infecção. Além disso, como a replicação de um vírus parece explorar a atividade transcricional das células produtoras de IFN-I e é regulada pela atividade parácrina dos mesmos, propomos avaliar o impacto da sinalização do receptor do IFN-I no espalhamento viral.

Inicialmente construímos células A549-*mCherry* e A549-IFANR1-KO nocautes para a cadeia I do receptor do IFN-I. Em experimentos de cultura mista foi possível identificar diferenças significativas nos tamanhos de placas viral, ao utilizarmos vírus repórter GFP, além de diferenciarmos as células infectadas, ao utilizarmos células selvagens (WT) repórter *mCherry*. A avaliação da dinâmica de resposta ao IFN durante a infecção viral pelas técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência em culturas celulares WT e IFNARI-KO. Para observar a produção dos IFN-I espaço-

temporalmente e dentro do contexto do *locus* gênico original de maneira concomitante ao espalhamento viral, células derivadas de animais IFN β -YFP foram utilizadas.

Nossos dados sugerem que a ação parácrina das células da periferia da placa possui uma maior relevância na contenção viral e que a comunicação entre as células contribui para a resposta antiviral. Esses eventos sugerem que há uma amplificação de sinal dependente de contato celular. Ao monitorar a dinâmica de ativação de IFN e observar a influência do seu efeito em populações mistas utilizando os vírus repórter GFP, os resultados podem contribuir para o entendimento da relação entre os vírus e a resposta do hospedeiro nos momentos iniciais de uma infecção.

Palavras-chave: Interferon, espalhamento viral, ação parácrina, comunicação celular, cultura mista.

ABSTRACT

During a viral infection, cells are able to identify pathogen-associated microbial patterns and activate a type 1 Interferons (IFN-I) mediated response. These IFNs may act in a paracrine and autocrine manner and are responsible for inducing an antiviral state. However, within a population of genetically identical cells, a phenotypic diversity is observed, related to the probabilistic events of control of genetic and protein expression. Interestingly, in a given population, the cells that produce IFN-I are also the ones with the highest production of viral proteins. The hypothesis that underlies this work is that the viral spread is regulated temporally by the paracrine activity of the IFN-I produced by the cells of the periphery of the infection plaque, and that the spread of a virus in a cell monolayer explores the transcriptional activity of IFN-I producing cells and is regulated by the paracrine activity of the same. Therefore, we propose to evaluate the impact of IFN-I receptor signaling on viral spread.

Initially we constructed A549-mCherry and A549-IFANR1-KO cells, knockouts for IFN-I receptor I chain. In co-culture experiments, it was possible to identify significant differences in viral plaque sizes, when using GFP reporter virus, besides differentiating the infected cells, when reporter mCherry wild cells (WT) are used. Evaluation of the dynamics of IFN response during viral infection by flow cytometry techniques and fluorescence microscopy in WT and IFNARI-KO cell cultures. To observe the IFN-I production and within the context of the original gene locus concomitantly to viral spread, cells derived from IFN β -YFP animals were used.

Our data suggest that the paracrine action of the peripheral cells of the plaque has a greater relevance in the viral containment and that communication between the cells contributes to the antiviral response. These events suggest that there is signal amplification dependent on cell contact. Monitoring the dynamics of IFN activation and observing the influence of its effect on mixed populations using GFP reporter viruses may thus contribute to the understanding of the relationship between viruses and host response at the early stages of infection.

Keywords: Interferon, viral spread, paracrine action, cellular communication, co-culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Vírus de DNA	22
Figura 2: Vírus de RNA	23
Figure 3: Vias de indução de interferon tipo I	33
Figura 4: Produção de células A549- <i>mCherry</i>	55
Figura 5A: Caracterização da linhagem A549- <i>mCherry</i>	57
Figura 5B: Caracterização da linhagem A549- <i>mCherry</i>	58
Figura 6: Produção de células A549-IFNAR1-KO	59
Figura 7: Proteção do IFN-I e IFN-II na infecção viral	62
Figura 8: O impacto do IFANR1 no espalhamento do vírus DENV2	65
Figura 9: O impacto do IFANR1 no espalhamento do vírus HSeGFP	67
Figura 10: O impacto do IFANR1 no espalhamento do vírus VACVeGFP	69

Figura 11: O impacto do IFANR1 no espalhamento do vírus VSVeGFP	71
Figura 12: <i>Phosflow</i> da placa de infecção	73
Figura 13: Bloqueio da comunicação entre as células	76
Figura 14: MEF estimuladas com <i>poly I:C</i>	78
Figura 15: Expressão diferencial das populações de MEF	79
Figura 16: Células IFN-Ds-Red	101
Figura 17: Digestão do vetor <i>pX330</i>	102
Figura 18: Digestão do vetor <i>pX459.V2</i>	103
Figura 19: PCR de colônia do vetor <i>pX300-IFNβ1</i>	104
Figura 20: PCR de colônia do vetor <i>pX459.V2-IFNβ2</i>	105
Figura 21: Validação das construções <i>pX330-IFNβ1</i> e <i>pDonor-DsRed</i>	107
Figura 22: Controle de transfecção	109

Figura 23: Separação das células por <i>Cell sorting</i>	110
Figura 24: Genótipo dos clones IFN β -DsRed	112
Figura 25: Mutagênese do vetor <i>pDonor-DsRed</i>	113
Figura 26: Sonda <i>Smart Flare IFNβ-Human, Cyanine 5</i>	115
Figura 27: Padronização da sonda <i>Smart Flare IFNβ-Human, Cyanine 5</i>	117
Figura 28: Microscopia confocal com a sonda <i>Smart Flare IFNβ-Human, Cyanine 5</i>	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens celulares	38
Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos	121
Tabela 3: Anticorpos utilizados nos experimento de imunofluorescência, <i>Phosflow</i> e <i>Western blotting</i>	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S	RNA ribosomal 18S
AP-1	Proteína ativadora 1
CARD	Domínio de recrutamento de caspase
Cas9	<i>CRISPR associated 9</i>
CBX	<i>Carbenoxolone disodium</i>
cDNA	DNA complementar
cGAMP	GMP/AMP cíclico sintetase
CMC	Carboximetilcelulose
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-PK	Proteína quinase dependente de DNA
DENV	<i>Dengue vírus</i>
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsDNA	DNA de fita dupla
DsRed	<i>Discosoma sp.</i> - Proteína vermelha fluorescente
dsRNA	RNA de fita dupla
ECMV	<i>Encephalomyocarditis vírus</i>
gDNA	DNA genômico
GFP	Proteína fluorescente verde
HEK293	<i>Human embryonic kidney cell line</i>
HSV	<i>Herpes simplex vírus</i>
IFI16	Fator 16 induzido por IFN γ
IFN	Interferon
IFN-I	Interferon tipo 1
IFN-II	Interferon tipo 2
IFNAR	Receptor de IFN tipo 1
IFNGR	Receptor de IFN tipo 2
IL	interleucina
IRES	Entrada interna de ribossomos
IRF	Fator de resposta ao interferon
ISG15	Genes estimulados por IFN de 15 kDa
ISGF3	<i>IFN-stimulated gene factor 3</i>
ISGs	Genes estimulados por IFN

ISRE	Elementos de resposta estimulada por IFN
iVSV	Vírus da estomatite vesicular inativado
JAK	Janus quinase
KO	Nocaute
L15	<i>Leibovitz's L-15 Medium</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPKs	Proteínas quinase ativadas por mitógenos
MAVS	<i>Mitochondrial Activator of Virus Signaling</i>
<i>mCherry</i>	Proteína fluorescente <i>mCherry</i>
MDA5	Gene 5 associado à diferenciação de melanoma
MEF	Fibroblasto embrionário murino
MOI	Multiplicidade de infecção
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NFκB	Fator nuclear kappa B
NFκBIA	Inibidor alfa do fator nuclear kappa B
NS	Proteínas não estruturais
NTC	Controle negativo
P1	Primeira passagem
p65	Fator nuclear kappa B, subunidade 65
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>

PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidades formadoras de placa
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
<i>poly I:C</i>	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
qSP	Quantidade suficiente para
RIG-I	Gene induzível por ácido retinóico
RLRs	Receptores semelhantes à RIG-I
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SeV	<i>Sendai vírus</i>
SF	Sonda <i>SmartFlare</i>
SFB	Soro fetal bovino
sgRNA	Guia de RNA simples fita
ssDNA	DNA de fita simples

ssRNA	RNA de fita simples
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STING	Gene estimulador de IFN
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TBK1	<i>Tank-binding kinase</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N-N,N-tetrametilenediamina
TLRs	Receptores tipo Toll
TRIF	Domínio TIR contendo adaptadora que induz IFN β
TYK2	Quinase de tirosina 2
V	Volts
VACV	<i>Vaccinia vírus</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
WT	Selvagem
YFP	Proteína fluorescente amarela

SUMÁRIO

1.1. VÍRUS	21
1.1.1. DENV – Dengue vírus	24
1.1.2. HSV – Herpes Simplex	25
1.1.3. VACV – Vaccinia virus.....	26
1.1.4. VSV – Vesicular Stomatitis virus	28
1.2. IMUNIDADE INATA	29
1.2.1. Interferons (IFN)	31
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. OBJETIVO GERAL.....	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. METODOLOGIA	37
3.1. CULTURA CELULAR	37
3.1.1. Cultura primária de fibroblasto embrionário murino (MEF) ..	38
3.1.2. Produção de células A549-mCherry	39
3.1.3. Produção de células A549-IFNARI-KO	40
3.2. ENSAIOS VIRAIS	41
3.2.1. PRODUÇÃO DOS VÍRUS	41
3.2.1.1. DENV (Dengue virus).....	41
3.2.1.2. HSVeGFP (Herpes simplex) e HSVmCherry.....	42
3.2.1.3. VACVeGFP (Vaccinia virus).....	43
3.2.1.4. VSVeGFP (Vesicular stomatitis virus)	43
3.2.2. Infecção viral.....	44
3.2.3. Ensaios de formação de placa.....	44
3.2.4. Titulação viral por placa de lise	45
3.3. ANÁLISE TRANSCRICIONAL.....	46
3.3.1. Caracterização genotípica	46
3.3.2. RT-qPCR	47
3.4. DETECÇÃO PROTEICA	48
3.4.1. Extração de proteína.....	48
3.4.2. Dosagem de proteínas	48

	20
3.4.3. <i>Western blotting</i>	49
3.4.4. <i>Imunofluorescência</i>	50
3.4.5. <i>Citometria de Fluxo</i>	50
3.5. QUANTIFICAÇÕES DE IMAGEM	52
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4. RESULTADOS	54
4.1. PRODUÇÃO DE CÉLULAS A549- <i>MCHERRY</i>	54
4.2. PRODUÇÃO DE CÉLULAS A549-IFNAR1-KO.....	58
4.3. O IMPACTO DO IFNAR1 NO ESPALHAMENTO VIRAL	63
4.4. ATIVAÇÃO CELULAR DURANTE A INFECÇÃO	72
4.5. EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM CÉLULAS MEF DURANTE A INFECÇÃO	77
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÃO	90
7. PERSPECTIVAS	91
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE – PRODUÇÃO DE CÉLULAS RESPONSIVAS IFNB-DSRED	100
CONSTRUÇÃO DOS VETORES	100
VALIDAÇÃO DOS CONSTRUTOS	105
TRANSFEÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES, DILUIÇÃO LIMITANTE E	
EXPANSÃO DAS COLÔNIAS	108
ANÁLISE FENOTÍPICA DAS COLÔNIAS	109
SEPARAÇÃO POR <i>CELL SORTING</i>	110
ANÁLISE GENOTÍPICA DAS COLÔNIAS	111
MUTAGÊNESE	113
<i>SMART FLARE</i>	113
ANEXO – LISTA DE REAGENTES	121

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vírus

Os vírus são os patógenos mais abundantes, diversificados e de rápida evolução que existem. Eles são classificados em mais de 60 famílias diferentes, de acordo principalmente com a síntese do RNAm (Ácido ribonucleico mensageiro), mas também pelas suas características estruturais (Figuras 1 e 2) (Baltimore, 1971; Sharp, 2002; Arribas et al., 2018).

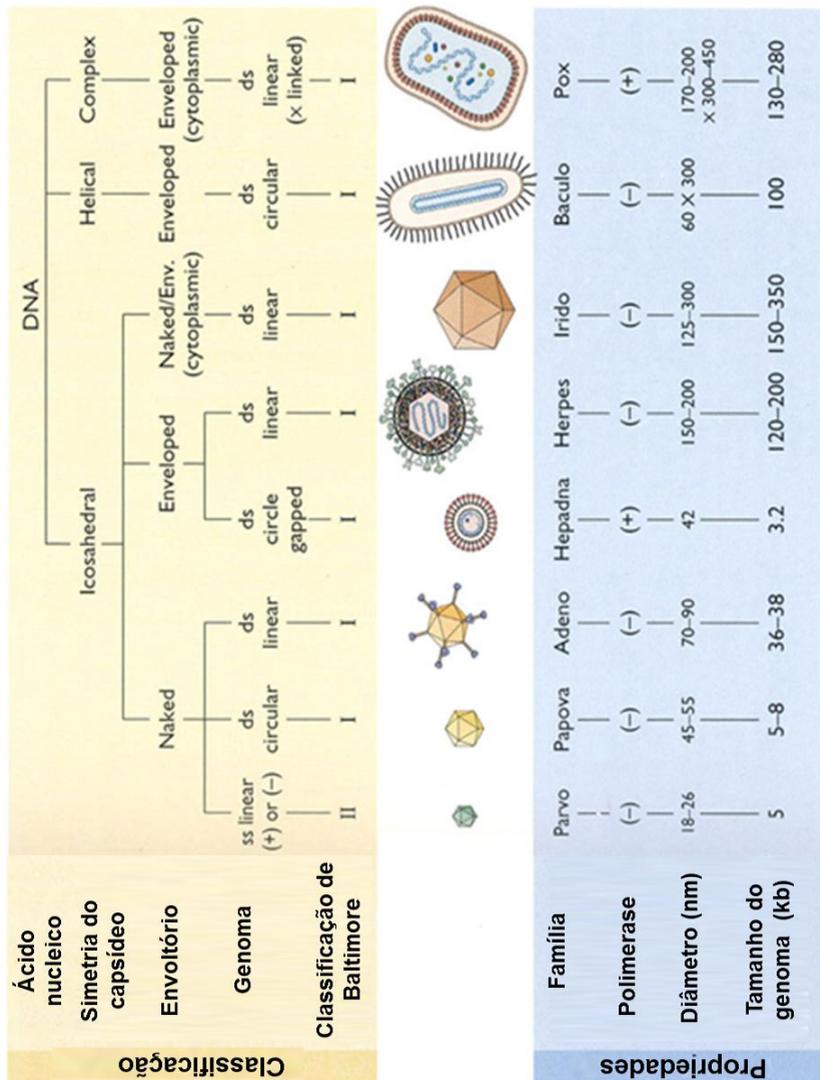
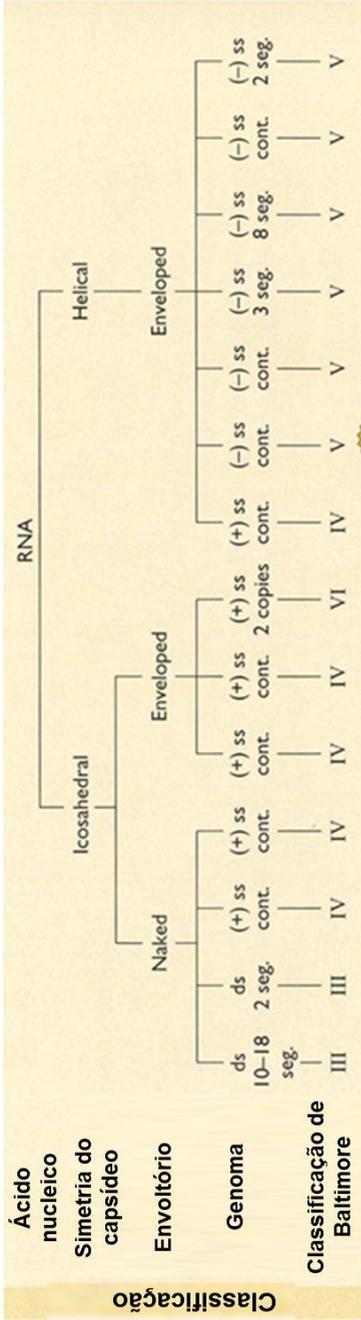


Figura 1: Vírus de DNA. Figura ilustrativa da diversidade de famílias virais que infectam animais. Classificação feita a partir de características de simetria, presença de envoltório viral e estrutura do genoma. Figura adaptada do web site: <<http://bioinformatica.uab.cat/biocomputacio/treballs200607/EdsonCumes/taxonomia.html>>.



Família	Polimerase	Diâmetro (nm)	Tamanho do genoma (kb)
Reo	(+)	60-80	22-27
Birna	(+)	60	7
Calici	(-)	35-40	8
Picornia	(-)	28-30	7.2-8.4
Flavi	(-)	40-50	10
Toga	(-)	60-70	12
Retro	(+)	80-130	3.5-9
Corona	(-)	80-160	16-21
Filo	(+)	80 X 790-14,000 85 X 130-380	12.7
Rhabdo	(+)	70-85 X	13-16
Bunya	(+)	90-120	13.5-21
Orthomyxo	(+)	90-120	13.6
Paramyxo	(+)	150-300	16-20
Arena	(+)	50-300	10-14

Figura 2: Vírus de RNA. Figura ilustrativa da diversidade de famílias virais que infectam animais. Classificação feita a partir de características de simetria, presença de envelope viral e estrutura do genoma. Figura adaptada do web site: <<http://bioinformatica.uab.cat/biocomputacio/treballs200607/EdsonCumes/taxonomia.html>>.

Em virtude de sua diversidade, os vírus são as principais causas de morbidade e mortalidade entre humanos e animais (Arribas et al., 2018; Rückert e Ebel, 2018). Por serem parasitas intracelulares obrigatórios, necessitam de estratégias para evadir o sistema imunológico do hospedeiro. Contudo, patógeno e hospedeiro, estão em constante processo de adaptação (Elde e Malik, 2009; Secombes e Zou, 2017; Arribas et al., 2018).

1.1.1. DENV – *Dengue vírus*

O vírus da dengue (DENV) é um vírus de RNA fita simples (ssRNA) senso positivo. O DENV pertencente à família *Flaviviridae* possui 50 nm de diâmetro e é composto de três proteínas estruturais — proteína do capsídeo, proteína precursora de membrana e proteína de envelope —, além de sete proteínas não estruturais (NS) denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Kuhn et al., 2002). Possui quatro sorotipos distintos: *Dengue vírus* sorotipo 1 (DENV1), *Dengue vírus* sorotipo 2 (DENV2), *Dengue vírus* sorotipo 3 (DENV3) e *Dengue vírus* sorotipo 4 (DENV4). Todos os sorotipos infectam humanos e são transmitidos pelo inseto-vetor *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Kuhn et al., 2002; Rückert e Ebel, 2018).

Os DENVs possuem tropismo por células da linhagem linfóide (Rothman, 2011; Green et al., 2013). O processo de replicação viral tem

início quando o vírus se liga aos receptores de superfície celular e é internalizado através da formação de vesículas endocíticas recobertas por clatrina (Green et al., 2013; Screaton et al., 2015). A acidificação do endossoma possibilita a mudança conformacional da estrutura da proteína de envelope, que se funde com a membrana endocítica (Green et al., 2013; Screaton et al., 2015). Esse poro de fusão permite que o nucleocápsídeo seja liberado e o RNA viral desnudado, sendo liberado no citoplasma onde se direciona para o retículo endoplasmático rugoso, para a tradução de uma única poliproteína. Posteriormente esta é clivada por proteases virais e do hospedeiro e a montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (Green et al., 2013; Screaton et al., 2015).

A infecção resulta em um quadro febril, autolimitante de duração entre três e sete dias. No entanto, em alguns pacientes, uma vasculopatia transitória se desenvolve entre os dias três e seis de doença. O aumento na permeabilidade vascular pode ocorrer em alguns casos de gravidade suficiente para induzir o choque hipovolêmico denominado de síndrome de choque de dengue (Simmons et al., 2012).

1.1.2. HSV – *Herpes Simplex*

O vírus *Herpes simplex* (HSV), é um vírus de DNA fita dupla (dsDNA) linear de 150 – 200 nm de diâmetro de forma esférica icosaédrica, composto por um cromossomo e uma camada amorfa de proteínas tegumentais. Ligadas ao capsídeo em um envelope lipídico exterior em que diferentes glicoproteínas virais estão incorporadas, sendo a principal proteína do capsídeo a VP5 (UL19) (Newcomb et al., 2006; Toropova et al., 2011).

O HSV entra nas células, ligando-se aos receptores da superfície celular por glicoproteínas de envelope. Após a fusão entre o envelope viral e a membrana celular do hospedeiro, ocorre a liberação do nucleocapsídeo para o citoplasma (Kornfeind e Visalli, 2018). O capsídeo é direcionado para o poro nuclear onde o genoma viral é liberado. A replicação do DNA viral, montagem do nucleocapsídeos virais, clivagem e empacotamento do DNA genômico viral ocorre no núcleo. Os nucleocapsídeos ao saírem do núcleo se transformam em partículas virais infectantes (Kornfeind e Visalli, 2018).

Os HSV são patógenos que não são eliminados e que ocasionalmente podem apresentar períodos de latência. A infecção pelo HSV pode ser devida ao vírus do herpes simples tipo 1 (HSV1) ou ao vírus do herpes simples de tipo 2 (HSV2) (WHO, 2018). O HSV1 é transmitido principalmente por contato oral e pode causar infecção ao redor da boca (herpes oral). A transmissão do HSV2 é quase que exclusivamente sexual, causando infecção na área genital ou anal (herpes genital). Entretanto, o HSV1 também pode ser transmitido para a área genital através do contato oral-genital (WHO, 2018).

1.1.3. VACV – *Vaccinia virus*

Utilizado para erradicar a varíola, o *Vaccinia virus* (VACV) é pertencente à família *Poxviridae* de genoma linear, constituído por um dsDNA de aproximadamente 200 kb (Fenner et al., 1988; Hollinshead et al., 1999). É um vírus envelopado de forma ovoide, com 220 - 450 nm de comprimento e 140 - 260 nm de largura.

Todos os poxvírus possuem replicação citoplasmática e existem duas partículas infecciosas distintas, o vírus intracelular maduro (IMV) e o vírus extracelular envelopado (EEV), sendo que ambas são infectivas (Hollinshead et al., 1999; McFadden, 2005; Condit et al., 2006). Os vírus IMV e EEV se diferem em suas glicoproteínas de superfície e no número de membranas de envolvimento. Os vírus se ligam as células por proteínas determinadas glicosaminoglicanos presentes na superfície da célula-alvo ou por componentes da matriz extracelular (McFadden, 2005; Condit et al., 2006). A replicação viral totalmente permissiva é caracterizada por três ondas de RNAm viral e síntese de proteínas, conhecidas como intermediário e tardio, que são seguidos pela morfogênese das partículas infecciosas. O IMV é transportado via microtúbulos e é envolvido com membrana derivada do complexo de Golgi. O vírus funde-se à membrana da superfície celular para formar vírus envelopado, que é liberado pela célula através da polimerização de actina ou é libertada para formar EEV livre. O EEV também pode ser formado por brotamento do IMV (Hollinshead et al., 1999; McFadden, 2005; Condit et al., 2006).

A membrana de superfície exhibe túbulos de superfície ou filamentos de superfície (Hollinshead et al., 1999; Condit et al., 2006). Os poxvírus modulam diversas vias de resposta intracelular que culminam na inibição da cascata de produção e sinalização de interferon, visando principalmente à proteína IRF3 hospedeira (Unterholzner et al., 2011; Smith et al., 2018).

1.1.4. VSV – *Vesicular Stomatitis virus*

O *Vesicular Stomatitis virus* (VSV) é pertencente à família *Rhabdoviridae* e possui como genoma uma molécula de ssRNA senso negativo, de aproximadamente 11 kb que codificam as proteínas que formam o nucleocapsídeo, polimerase, glicoproteína de superfície e proteínas de matriz periférica e proteínas ligadoras de RNA (Abraham e Banerjee, 1976; Thomas et al., 1985; Barber, 2005; Basak et al. 2007). É um vírus envelopado de 180 nm de largura e 75 nm de diâmetro (Thomas et al., 1958; Albertin et al., 2006). Alguns trabalhos mostram que a fosfatidil serina presente na membrana celular se liga a glicoproteínas virais e facilita a endocitose do VSV. Uma diminuição no pH dentro do endossomo induz a fusão da membrana e liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma. No citoplasma a polimerase viral se liga a porção 3' final do genoma e sintetiza os cinco RNAm de maneira individual, responsáveis pela codificação das proteínas e montagens dos novos vírus (Barber, 2005; Basak et al. 2007).

Apesar de poder infectar humanos, sua maior importância esta relacionada com a agropecuária, visto que os principais animais infectados são gado, cavalo e porcos (Katz et al., 1997). Sua manifestação clínica se caracteriza pela formação de vesículas ulcerativas nas regiões de mucosa, além de anorexia e letargia (Katz et al., 1997). Em virtude da alta taxa de produção de partículas virais defectivas, o VSV é um excelente estimulador da resposta imunológica do hospedeiro, sendo amplamente utilizado em diversos estudos (Tober et al., 2014; Henao-Restrepo et al., 2017).

1.2. Imunidade inata

A imunidade inata corresponde à primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos e é geneticamente programada para detectar características invariantes de microrganismos (Dolasia et al., 2017; Secombes et al., 2017). O sistema imune inato possui receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que detectam padrões moleculares conservados encontrados na maioria dos microrganismos de uma determinada classe (Janeway, 1989; Iwasaki e Medzhitov, 2010). Estas estruturas são referidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são essenciais para a sobrevivência do microrganismo e, portanto, são difíceis de serem modificados (Akira, Uematsu e Takeuchi, 2006; Iwasaki e Medzhitov, 2010; Dolasia et al., 2017).

Dentre os receptores responsáveis pela detecção de vírus, existem os receptores semelhantes à RIG-I (RLRs). Eles correspondem a uma família de proteínas citoplasmáticas especializadas na detecção de ácidos nucleicos. Entre os RLR, os receptores citoplasmáticos do gene induzível por ácido retinoico (RIG-I) e do gene 5 associado à diferenciação de melanoma (MDA5) apresentam duas porções N-terminais de domínio de recrutamento de caspase (CARD) que reconhecem ssRNA (RNA de fita simples) e dsRNA (RNA de fita dupla) (Kang et al., 2002; Yoneyama et al., 2004; Yoneyama et al., 2005). RIG-I e MDA5 se associam à proteína MAVS (*Mitochondrial Activator of Virus Signaling*) levando à ativação das quinases, TBK1 (*Tank-binding kinase*) e I κ B quinase α e β . Essas quinases promovem a fosforilação e ativação de fatores de transcrição importantes, como a

ativação do fator nuclear kappa B (NFκB), proteína ativadora 1 (AP-1) e a fosforilação e dimerização do fator de resposta ao interferon 3 (IRF3) ou ainda, a fosforilação e dimerização do fator de resposta ao interferon 7 (IRF7) (Kang et al., 2002; Yoneyama et al., 2004; Yoneyama et al., 2005).

A identificação de vírus com genoma de ssDNA (DNA fita simples) ou dsDNA também é feita por sensores citoplasmáticos, como por exemplo, o GMP/AMP cíclico sintetase (cGAMP) (Sun et al., 2013; Wu et al., 2013). O cGAMP é um dinucleotídeo de ação indutora na produção de citocinas, como o interferon (IFN) e o fator 16 induzido por IFN γ (IFI16) (Sun et al., 2013; Wu et al., 2013; Unterholzner et al., 2013).

A proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK), além de ter a função de reparo de DNA e rearranjo gênico para a produção de anticorpos (recombinação VDJ), está relacionada com o reconhecimento de dsDNA em fibroblastos (Ferguson et al., 2012). Essa proteína se liga ao gene estimulador de IFN (STING) e é capaz de recrutar e ativar TBKI e IκB, que por sua vez ativam os fatores IRF3 e NFκB, respectivamente (Barber, 2008; Ferguson et al., 2012; Wu et al., 2013; Unterholzner et al., 2013; Ishikawa e Abe e Barber, 2014; Mansur et al., 2014).

Outros PRRs incluem a família dos receptores tipo Toll (TLRs). Os TLRs são receptores transmembrânicos que possuem múltiplos módulos extracelulares ricos em leucinas, que se ligam diretamente aos PAMPs (Dolasia et al., 2017; Secombes e Zou, 2017). Os TLRs em mamíferos são expressos na membrana plasmática ou em endossomos e reconhecem padrões microbianos que são conservados. Os TLRs

endossomais detectam principalmente ácidos nucleicos, tais como o dsRNA (TLR3), ssRNA (TLR7/TLR8) e dsDNA e ssDNA (TLR9) (Barton et al., 2006; Crozat e Beutler, 2004; Iwasaki e Medzhitov, 2010). Os TLRs TLR7/TLR8 e TLR9 se ligam a adaptadores denominados de MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88), que levam a ativação de NF κ B e IRF7. O TLR3 induz a sinalização via a proteína adaptadora TRIF (domínio TIR contendo adaptadora que induz IFN β) que resulta na ativação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas importantes para o desenvolvimento da resposta imune inata antiviral, como os interferons (Honda et al., 2005; Honda et al., 2005b; Pichlmair e Reis e Sousa; 2007).

1.2.1. Interferons (IFN)

Os interferons (IFNs) foram descobertos em 1957, por sua ação de inibição da infecção viral. São divididos em três classes: IFN tipo 1 (IFN-I) compreendendo os subtipos IFN α_{1-14} , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , e IFN ω , IFN tipo 2 (IFN-II) IFN γ e IFN tipo 3 compreendendo os subtipos IFN λ_1 , IFN λ_2 , IFN λ_3 , ou IL29, IL28A, e IL28B, sendo os IFN-I os principais mediadores químicos em resposta contra os vírus (Isaacs e Lindenmann, 1957; Schneider et al., 2014). Os IFN-I constituem a maior classe de IFNs, estão agrupados no cromossomo 9 em humanos e sua sinalização ocorre via o receptor transmembranar heterodimérico denominado IFNAR, o qual é composto por duas subunidades IFNAR1 e IFNAR2 (Platanias, 2005; Kaur e Platanias, 2013; Schneider et al., 2014).

Após a ligação dos IFN-I ao seu receptor, podem ser induzidas múltiplas vias posteriores de sinalização. A sinalização canônica ocorre quando o IFN-I se liga ao IFNAR presente na membrana que ativa a proteína Janus quinase (JAK1) e tirosina quinase 2 (TYK2), que fosforilam os fatores de transcrição STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) e STAT2 (Darnell et al., 1994; Ihle, 1995). STAT1 e STAT2 fosforiladas dimerizam e translocam-se para o núcleo, onde se associam ao fator 9 de regulação de IFN (IRF9) para formar um complexo denominado ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*) (Levy et al., 1990). ISGF3 liga-se na região de motivo de DNA, conhecida como elemento de resposta estimulada por IFN (ISRE) de sequência TTTCNNTTTC e ativam a transcrição de genes estimulados por IFN (ISGs), que possuem como função a inibição da transcrição e replicação do patógeno, bem como a regulação da via dos IFNs (Schoggins et al., 2011; Kaur e Plataniias, 2013).

Os IFN-I também podem sinalizar através de homodímeros STAT1, que são mais comumente associados à via de sinalização mediada pelo IFN γ (Schoggins et al., 2011; Kaur e Plataniias, 2013). Outros STATs em heterodímeros e homodímeros também podem ser ativados posteriormente, incluindo STAT3, STAT4 e STAT5 (McNab et al., 2015). Outras vias de sinalização que não dependem da atividade JAK-STAT também podem ser ativadas, incluindo as proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) e a via de fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), levando a diversos efeitos sobre a célula (McNab et al., 2015). A sinalização do IFN-I está representada de forma esquemática na Figura 3.

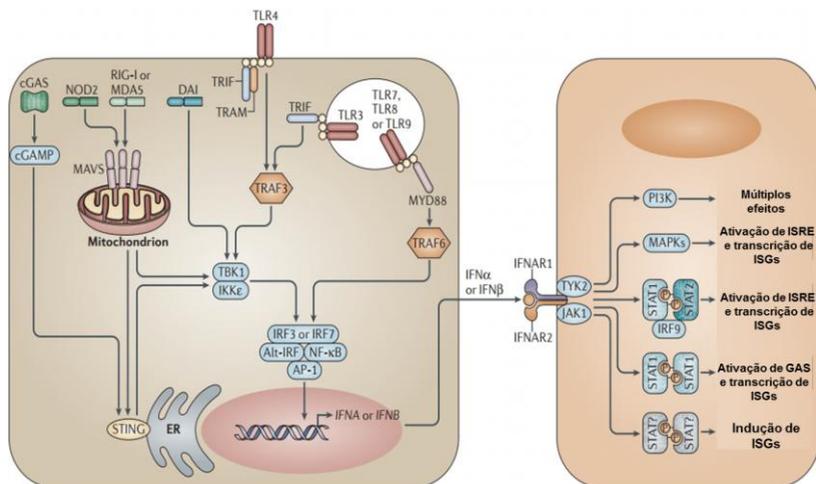


Figura 3: Vias de indução de interferon tipo I. O reconhecimento de padrões microbianos é feito por uma gama de receptores de reconhecimento de padrões celulares e intracelulares, como os TLRs e RIG-I. Esses por sua vez podem levar à indução dos fatores de transcrição que proporciona a transcrição dos IFNs. Na ligação dos IFN-I ao seu receptor, podem ser induzidas múltiplas vias de sinalização, como a sinalização canônica via JAK-STAT que culmina na ativação de ISGF3 que se liga as regiões promotoras ISREs, levando à indução das ISGs. Os IFN-I também podem ativar as vias de MAPKs e de PI3K. Figura adaptada de McNab et al., 2015.

Além disso, os eventos que antecedem a ativação dos IFN-I são amplamente estudados. O modelo criado por Apostolou e Thanos em 2008, para explicar como ocorre a ativação dos mecanismos antivirais, sugere que a indução estocástica de IFN β está relacionada com o nível de expressão de outros fatores, como NF κ B e IRFs. A expressão do IFN β ocorre após a formação de um *enhanceosome*, um complexo proteico que após o acoplamento de diferentes fatores é capaz de promover alterações na cromatina, que gera a abertura de regiões promotoras e o recrutamento de fatores de transcrição celular (Thanos e Maniatis, 1995; Maniatis et al., 1998; Apostolou e Thanos, 2008). O IFN β , após sua produção, é secretado e pode atuar de forma parácrina

ou autócrina. Sua ação parácrina é bem estabelecida (Hu et al., 2007; Rand et al., 2012; Patil et al., 2015), contudo poucos trabalhos mostram sua ação autócrina (Marie et al., 1998; Kim et al., 2014; Warrick et al., 2016; Cai et al., 2017).

O aumento da expressão de IFN β está associado à ativação de fatores importantes na resposta antiviral. A baixa concentração de NF κ B e IRF7 durante o estado de homeostase celular, sugere a necessidade da formação do *enhanceosome* para o controle da expressão gênica (Thanos e Maniatis, 1995; Marié et al., 1998; Hu et al., 2007; Apostolou e Thanos, 2008).

Ademais, Zhao e colaboradores em 2012 utilizaram cultura de fibroblastos derivados de embriões murinos que apresentavam a inserção da sequência IRES-YFP (Proteína Fluorescente Amarela), seguida ao gene do IFN β e demonstraram que durante a infecção por SeV (*Sendai virus*) tanto células produtoras de IFN como as células não produtoras de IFN eram infectadas. Entretanto, as células que produziam IFN possuíam uma alta taxa de replicação e transcrição viral, além de apresentarem maiores concentrações de RIG-I e MDA5, quando comparadas com células que não produziam IFN (Zhao et al., 2012). Nesse mesmo estudo foi demonstrado que os IFNs são produzidos em pequena quantidade e sua ação é dependente da difusão do meio no qual as células estão (Voigt e Yin, 2015; Warrick et al., 2016; Cai et al., 2017).

Contudo, dentro de uma população de células geneticamente idênticas, cultivada no mesmo ambiente, observa-se uma diversidade fenotípica frente à produção de IFN β , relacionada aos eventos probabilísticos de controle da expressão gênica e proteica (Zhao et al.,

2012; Hu et al., 2007). A partir do exposto, nossa hipótese é que o espalhamento viral é regulado pela atividade parácrina dos IFNs-I produzidos pelas células da periferia da placa de infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto da resposta celular individual no espalhamento de diferentes vírus e a interferência da produção e resposta do IFN β no decorrer da infecção.

2.2. Objetivos Específicos

- Produzir linhagens celulares A549-*mCherry* e A549-IFNAR1-KO;
- Avaliar a correlação temporal entre a indução do IFN β e a replicação viral na presença e ausência das atividades dos IFN-I;
- Avaliar o impacto da ativação da via de IFN-I na disseminação dos vírus DENV2, HSV, VACV e VSV, e consequente produção dos mesmos em células humanas e murinas.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura celular

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho estão elencadas na tabela 1. De modo geral as células foram mantidas na estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ com de meio de cultura DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific) ou L15 (Leibovitz's L-15 Medium – Thermo Fisher Scientific), suplementado com L-glutamina (2 mM – Thermo Fisher Scientific), penicilina (200 µg/mL – Thermo Fisher Scientific), estreptomicina (200 µg/mL – Thermo Fisher Scientific) e 10 % de soro fetal bovino (SFB – Thermo Fisher Scientific). As passagens das células eram realizadas quando a cultura celular atingia a confluência de aproximadamente 90 %. Para isso, o meio de cultivo era retirado, as células então eram lavadas com PBS 1 X e acrescentado uma solução de tripsina 0,05 % (Gibco – Thermo Fisher Scientific). Após as células se desprenderem da placa de cultivo, elas eram centrifugadas a 460 xg por cinco minutos a temperatura ambiente em tubos de 15 mL. Após o termino da centrifugação, o sobrenadante era drenado e as células ressuspensas em meio de cultivo. As células eram cultivadas até atingirem a passagem 15 (P15).

Tabela 1: Linhagens celulares. Células de linhagem celular utilizadas neste trabalho.

Sigla	Tipos celulares	ATCC
A549	Célula epitelial pulmonar humana (Giard et. al., 1973)	ATCC CCL-185
BHK-21	Fibroblasto de rim de hamster (Macpherson, 1970)	ATCC CCL-10
C636	Células de <i>Aedes albopictus</i> clone C6/36 (Singh KRP, 1967)	ATCC CRL-1660
HEK293	Fibroblasto de rim humano (Graham et. al., 1977)	ATCC CRL-1573
Vero	Fibroblasto de rim de macaco (Sasaki, et al. 1964)	ATCC CCL-8

3.1.1. Cultura primária de fibroblasto embrionário murino (MEF)

O estabelecimento da cultura de fibroblastos murinos (MEFs) foi realizado a partir de camundongos da linhagem C57bl/6 e C57bl/6-IFN β -YFP, mantidos no Biotério Setorial MIP com água e ração *Ad libitum* (CEUA P00880). As células foram isoladas a partir de embriões de camundongos de 11 a 14 dias pós-coito. Para isso os camundongos foram eutanasiadas e os embriões retirados do interior da fêmea. Com o auxílio de um bisturi foram retiradas as porções da cabeça e órgãos internos. O corpo embrionário foi triturado e mantido em estufa úmida contendo 5 % de CO₂ a 37 °C com tripsina 0,05 % (Gibco – Thermo

Fisher Scientific) e *DNase* I (10 U - Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos. As células foram transferidas para tubos de 15 mL e centrifugados por cinco minutos as 460 xg (JOZEF CZUK et al., 2012). As células foram ressuspensas e mantidas em meio de cultura DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific), suplementado com L-glutamina (2 mM – Thermo Fisher Scientific), penicilina (200 µg/mL – Thermo Fisher Scientific), estreptomicina (200 µg/mL – Thermo Fisher Scientific) e 10 % de soro fetal bovino (SFB – Thermo Fisher Scientific) e mantidas em estufa úmida, a 37 °C. Os experimentos foram realizados com células em primeira passagem (P1).

3.1.2. Produção de células A549-*mCherry*

Para produzir uma linhagem de células A549 fluorescente, produzimos vetores lentivirais *mCherry*-puromicina. Para isso, células da linhagem HEK293 (*Human embryonic kidney cell line* ATCC CRL-1573 – Graham et. al., 1977) foram transfectadas pela metodologia de fosfato de cálcio (Sambrook e Russell, 2006) com os vetores *pCDHCMVmCherryT2Apuro* (Addgene Plasmid #72264) juntamente com os vetores que codificam as sequências gag-pol-rev (*psPAX2* Addgene Plasmid #12260) e VSV-G (*pCMVVS* Addgene Plasmid #8454), para a produção das partículas virais. Decorridas 72 horas da transfecção, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado a 460 xg por cinco minutos, filtrado com filtro 44 µm e congelado em alíquotas de 1 mL no – 80 °C. Desses vírus, 1 mL do sobrenadante foi adicionado a cultura de células da linhagem A549 (ATCC CCL-185 – Giard et. al., 1973), previamente cultivadas em placa de 6-poços na

concentração de $2,5 \times 10^5$ cels./poço por duas horas e acrescentado 1 mL de meio DMEM. Após 24 horas da transdução, as células foram selecionadas com o antibiótico Puomicina ($2,5 \mu\text{g/mL}$ – Thermo Fisher Scientific) por sete dias. Após esse período foi feita a diluição limitante das células, expansão e análise dos clones quanto à expressão da proteína fluorescente *mCherry* pela técnica de microscopia de fluorescência visualizadas ao microscópio de fluorescência convencional (Olympus BX40) com câmera acoplada (Olympus DP72). As imagens foram adquiridas através do software *Olympus Cell P*. A discriminação de fluorescência em experimentos de cultura mista, com células não marcadas, foi realizada pela técnica de citometria de fluxo, no equipamento FACS Verse (BD Biosciences).

3.1.3. Produção de células A549-IFNAR1-KO

Para a produção de uma linhagem IFNAR1-KO, a linhagem celular A549 foi transfectada com os vetores da empresa *Horizon* (guide 148472 5'-GCAGCCGCAGGTGAGAGGCG-3' e guide 148469 5'-CTGCGGCGGCTCCCAGATGA-3') utilizando o reagente de transfecção FuGENE (Promega – Madison, WI, USA). As células foram plaqueadas (1×10^5 cels./poço) e submetidas ao protocolo de transfecção específico para o tipo celular (proporção 3:1 – FuGENE:DNA). Estas células foram mantidas em placas de 12-poços, na estufa a 37°C , em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2 com 0,5 mL de meio de cultura DMEM-F12c (10 % SFB; 1 % L-glutamina; 1 % pen/strep). 72 horas pós-transfecção, as células foram tripsinizadas e diluídas em meio DMEM-F12c (10 % SFB; 1 % L-glutamina; 1 % pen/strep) e

distribuídas em placas de 96-poços no número de 0,5 cels./poço (volume final de 200 μ L/poço), sendo mantidas em estufa a 37 °C, na atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ por 10 –14 dias para sua expansão para placas de 24-poços.

3.2. Ensaios Virais

3.2.1. Produção dos vírus

3.2.1.1. DENV (*Dengue virus*)

A produção de DENV1 BR90 e DENV2 ICC266, ambos em passagem oito, teve início em uma garrafa de 25 cm² de células C636 (*Aedes albopictus* clone C6/36 ATCC CRL-1660 – Singh KRP,1967) infectadas com a multiplicidade de infecção (MOI 0,1) por seis dias e mantidas em meio L15 (Leibovitz's L-15 Medium – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) suplementado com L-glutamina (2 mM – Thermo Fisher Scientific), penicilina (200 μ g/mL – Thermo Fisher Scientific), estreptomicina (200 μ g/mL – Thermo Fisher Scientific) e 10 % de soro fetal bovino (SFB – Thermo Fisher Scientific) e mantidas na estufa a 27 °C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado a 460 xg por 10 minutos a 4 °C. Para a produção do estoque, quatro garrafas de 175 cm² foram infectadas com a MOI 0,1 durante o período de seis dias. O sobrenadante das culturas foi coletado, como descrito e armazenado a - 80 °C. A quantificação de células infectadas foi realizada por

citometria de fluxo no aparelho FACS Verse (BD Biosciences, California, EUA) e a titulação viral foi determinada por placa de lise.

3.2.1.2. HSVeGFP (*Herpes simplex*) e HSVmCherry

O vírus modificado HSVeGFP possui a proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a proteína viral VP22 (Elliott e O'Hare, 1999) o vírus HSVmCherry possui a proteína vermelha *mCherry* fusionada a proteína viral VP16 (Shivkumar et al., 2016). A produção do estoque viral passagem dois teve início com a infecção de uma garrafa de 25 cm² de células Vero (Vero ATCC CCL-8 – Sasaki et al., 1964) com MOI 0,1 em meio DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific) suplementado com L-glutamina (2 mM – Thermo Fisher Scientific), penicilina (200 µg/mL – Thermo Fisher Scientific), estreptomicina (200 µg/mL – Thermo Fisher Scientific) e 10 % de SFB (Thermo Fisher Scientific) e mantidas na estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. Após 48 horas o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado a 460 xg por 10 minutos a 4 °C. A partir do sobrenadante foi infectada uma garrafa de 75 cm² contendo células Vero. A garrafa foi mantida em cultura por quarenta e oito horas. O sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado nas mesmas condições citadas anteriormente. Foram feitas alíquotas de 200 µL do sobrenadante e as mesmas foram armazenadas a - 80 °C. As células infectadas foram quantificadas, pela expressão de GFP e de *mCherry* resultante da adição deste gene no genoma do vírus, pela técnica de citometria de fluxo no aparelho FACS Verse (BD Biosciences) e os títulos virais foram determinados por placa de lise.

3.2.1.3. VACVeGFP (*Vaccinia virus*)

O VACV utilizado neste trabalho apresenta a proteína GFP fusionada a proteína viral F13L (Husain e Moss, 2001). Para a produção de VACVeGFP passagem quatro, uma garrafa de 25 cm² de células Vero foi infectada com MOI 0,1 por quarenta e oito horas, cultivadas em meio DMEM-F12c (10 % SFB; 1 % L-glutamina; 1 % pen/strep) na estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. As células foram removidas com o auxílio do *cell scraper* (BD Biosciences) transferidas para um tubo de 50 mL, centrifugadas a 460 xg por 10 minutos a 4 °C e ressuspendidas em 1 mL de meio DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific). Para a produção do estoque, três garrafas de 175 cm² foram infectadas com MOI 0,1 durante o período de quarenta e oito horas. As células foram coletadas, como descrito anteriormente, ressuspendidas em 3 mL de meio DMEM e armazenado a - 80 °C.

Para a quantificação de células infectadas foi empregada à técnica de citometria de fluxo no aparelho FACS Verse (BD Biosciences) para a detecção de células positivas para a proteína GFP, resultante da adição deste gene no genoma do vírus. Os títulos virais foram determinados por placa de lise.

3.2.1.4. VSVeGFP (*Vesicular stomatitis virus*)

O vírus VSVeGFP possui a inserção do gene GFP no seu genoma seguida ao gene da proteína G e são codificados de forma independente (Stillman e Whitt, 1999). A produção do estoque do vírus VSVeGFP passagem três teve início com a infecção de uma garrafa de

75 cm² de células Vero com MOI 0,1 com meio DMEM-F12c (10 % SFB; 1 % L-glutamina; 1 % pen/strep) na estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. Após vinte e quatro horas o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado a 460 xg por 10 minutos a 4 °C. A partir do sobrenadante foram feitas alíquotas e armazenadas a - 80 °C. No decorrer do trabalho, a técnica de citometria de fluxo foi aplicada para a determinação das células infectadas através da expressão de GFP presente no genoma do VSV. Os títulos virais foram determinados por placa de lise.

3.2.2. Infecção viral

Em placas de 12-poços ou 24-poços previamente cultivadas com células da linhagem de interesse, que apresentaram aproximadamente 80% de confluência, foi adicionado meio de cultura DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific) contendo os vírus, sendo incubada por 90 minutos em estufa úmida a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO₂, e posteriormente lavada com PBS para remoção de partículas virais que não foram adsorvidos. Em cada poço foi adicionado meio DMEM-F12c e as placas foram novamente incubadas, em estufa úmida incubada a 37°C, em atmosfera de 5 % de CO₂, por tempos diferentes de acordo com a espécie do vírus.

3.2.3. Ensaios de formação de placa

Nos experimentos de formação de placa, as células foram avaliadas por microscopia de fluorescência, após a etapa de infecção foi

adicionado meio DMEM-F12c (1 % SFB; 1 % L-glutamina; 1 % pen/strep) e 3,2 % de carboximetilcelulose (CMC – Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). As células utilizadas na metodologia de citometria de fluxo foram cultivadas com meio DMEM-F12c (1 % SFB; 1 % L-glutamina; 1 % pen/strep) e agarose 1 % (Thermo Fisher Scientific).

3.2.4. Titulação viral por placa de lise

O sobrenadante das células infectadas por vírus foi coletado e submetido à diluição seriada, na base dez, em meio de cultura DMEM-F12 e transferido para placas de 12-poços ou 24-poços previamente cultivadas com células da linhagem Vero, em aproximadamente 70-80 % de confluência, para a titulação dos vírus HSV, VACV e VSV. Para a titulação de DENV2, foi utilizada a linhagem celular BHK-21 (ATCC CCL-10 – Macpherson, 1970) nas mesmas condições descritas anteriormente. A placa contendo as amostras diluídas do vírus foi incubada por 90 minutos, como descrito anteriormente. Foi adicionado meio DMEM-F12c (1 % SFB; 1 % L-glutamina; 1 % pen/strep) e 3,2 % CMC (Sigma-Aldrich) com objetivo de obter um meio com maior viscosidade. As placas foram novamente incubadas em estufa úmida a 37°C, em atmosfera de 5 % de CO₂, por tempos determinados de acordo com a espécie do vírus a ser titulado. Quando se observou a formação de unidades formadoras de placa (PFU), foi adicionado 500 µL por poço de paraformaldeído 3 % (PBS, pH 7,0) e incubado por uma hora em temperatura ambiente. A placa foi lavada três vezes com água corrente em fluxo baixo, e posteriormente foi adicionada uma solução de cristal

violeta 5 % (Sigma-Aldrich) com volume suficiente para cobrir o fundo do poço. Após 30 minutos de incubação foi realizada uma lavagem com água corrente em fluxo baixo. As PFU foram quantificadas para determinação do título viral.

3.3. Análise transcricional

3.3.1. Caracterização genotípica

Após a expansão das colônias em placas de 24-poços, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 460 xg por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de solução de lise (Proteinase K 200 µg/mL; NaOH 0,2 N; SDS 1 % m/v) e mantidas a 56 °C por 16 horas. Após este período, foram adicionados 50 µL de solução de neutralização (Acetato de potássio 5 M) e as amostras foram centrifugadas a 460 xg por três minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL contendo 200 µL de isopropanol e centrifugado a 460 xg por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de etanol 70 % e novamente centrifugado a 460 xg por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e após a secagem das amostras, elas foram ressuspensas em 20 µL de água ultrapura (Thermo Fisher Scientific).

A identificação da modificação gênica foi feita pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR), com a utilização dos oligonucleotídeos IFNAR1 sense e IFNAR1 antisense (anexo – tabela 2). As condições foram estabelecidas em nosso laboratório, respeitando as indicações do fabricante da *GoTaq DNA* polimerase (*Promega*), e

também com base nas temperaturas dos oligonucleotídeos. A reação ocorreu em 35 ciclos obedecendo às temperaturas de 94 °C para desnaturação por 30 segundos, 59 °C para o anelamento por 30 segundos e 72 °C para a extensão por 30 segundo. O volume final de reação foi 25 µL.

O produto de amplificação foi resolvido em gel de agarose 2,5 % em tampão tris-borato-EDTA (TBE, pH 8,0), com a ddp de 90 V (volts) por 1 hora. O gel foi corado com solução contendo brometo de etídio. Os produtos de amplificação esperados possuem 290 pb (pares de base) (células sem modificação - WT) e 187 pb (células nocautes).

3.3.2. RT-qPCR

A análise fenotípica das colônias foi feita pela técnica de RT-qPCR. A extração de RNAm foi realizada com o reagente *Trizol* (Thermo Fisher Scientific), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A síntese do cDNA foi realizada a partir de 1,5 ug do RNA total, utilizando o kit de transcrição reversa *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific). Para a reação do qPCR foi utilizado o *SYBR® Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante com volume final da reação de 10 µL. As amostras foram comparadas com o controle endógeno gene 18S. A expressão relativa dos genes foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde: $-\Delta\Delta Ct = -[(Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ endógeno}) \text{ amostra de analisada}] - [(Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ endógeno}) \text{ amostra normalizadora}]$. As alterações na quantidade de RNAm foram apresentadas como

expressão relativa ao controle (células parietais). Os valores foram expressos como a média da duplicata técnica.

3.4. Detecção Proteica

3.4.1. Extração de proteína

As células foram lavadas com PBS 1 X, extraídas da placa com auxílio de um *cell scraper* (BD Biosciences), lisadas com a solução de lise (10 mM NaH₂PO₄; 0,1 mM dTT; 0,1 % Triton; 1 mg/mL PMSF; pH 7,4) e homogeneizadas. Posteriormente foram armazenadas a – 20 °C, assim como o sobrenadante dos experimentos, que também foi retirado e armazenado com inibidor de protease (1 mg/mL PMSF – Sigma-Aldrich) para análises quantitativas de expressão proteica.

3.4.2. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas no extrato foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al. 1951), em microplacas (Costar), utilizando o kit DC™ *Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories Inc., Berkeley, CA, EUA) utilizando 5 µL de amostra juntamente com 25 µL de solução A (composição não fornecida pelo fabricante) e 200 µL de solução B (composição não fornecida pelo fabricante) incubado por quinze minutos a temperatura ambiente. Para a quantificação das proteínas utilizou-se albumina bovina (1 mg/mL) como padrão. A leitura foi realizada no *Spetra Max M2* (Molecular Devices) no comprimento de onda de 750 nm.

3.4.3. *Western blotting*

A análise qualitativa de proteínas encontradas nos lisados celulares foi feita por *western blotting*. O lisado celular com a adição de 5 μ L de *loading* (50 mM Tris-HCl pH 6,8; β mercapto 0,5 %; SDS 2 %; *bromophenol blue* 0,1 %; glicerol 10 %) foi aplicado em gel de SDS-poliacrilamida (solução de acrilamida 10 %; Tris pH 8,8 150 mM; SDS 0,1 %; persulfato de amônio 0,1 %; N,N,N,N-tetrametilenediamina (TEMED 0,04 %) em tampão Tris-glicina pH 8,3 (Tris básico 100 mM; Glicine 768 mM; SDS 10 %) para a separação das proteínas conforme a massa molecular. Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) no tampão Tris-HCl 0,15 M e Glicina 1,2 M, utilizando o *PowerPac HC Power Supply* (Bio-Rad), onde se aplicou uma corrente de 300 mA por 2 horas. A membrana foi lavada por dez minutos com TBS-T (Tris 20 mM; NaCl 500 mM Tween 20 0,2 %) e então bloqueada por uma hora com TBS-T contendo leite desnatado 5%. Após o bloqueio, a membrana foi lavada por três vezes com 10 mL de TBS-T e adicionou-se o anticorpo primário (Anexo – Tabela 3) em TBS-T/leite desnatado 5 % por 16 horas. Foram realizadas três lavagens com TBS-T e o anticorpo secundário (Anexo – Tabela 3) adicionado e mantido por duas horas. A membrana foi lavada novamente três vezes com TBS-T e depois incubada com *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific) para a revelação no fotodocumentador *DNR Bio-Imaging Systems* (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalém, Israel).

3.4.4. Imunofluorescência

Para as imunofluorescências dos clones A549-IFNAR1-KO, as células foram cultivadas sobre lamínulas de 13 mm, estimuladas com IL1 β (100 ng/mL – ImmunoTools, Friesoythe, Germany) por 30 minutos e fixadas com paraformaldeído 4 % (Sigma- Aldrich) por 20 minutos a temperatura ambiente. A permeabilização celular foi feita com PBS contendo 0,2 % Triton-X100 e mantida em solução de bloqueio (5 % de leite desnatado; PBS; 0,1% Triton-X20) por uma hora a temperatura ambiente. A amostra foi lavada com PBS e incubada com o anticorpo primário NF κ B p65 (Cell Signaling, Danvers, MA, EUA; diluição 1:500) diluído em PBS com 1 % de leite desnatado por uma hora a temperatura ambiente e detectado com o anticorpo secundário *Alexa Fluor 568 rabbit anti mouse IgG (H+L)* (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific; diluição 1:500), diluído em PBS incubado por uma hora a temperatura ambiente. As células foram contracoradas com DAPI (*4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride*, 1 mg/mL – Thermo Fisher Scientific) e visualizadas ao microscópio de fluorescência convencional (Olympus BX40) e as imagens obtidas com o acoplamento de uma câmera (Olympus DP72). As aquisições das imagens foram feitas através do software *Olympus Cell P*.

3.4.5. Citometria de Fluxo

Células infectadas por vírus que expressam o gene para codificação da proteína GFP ou *mCherry* foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas em 460 x g por 10 minutos. O

sobrenadante foi coletado e as células foram ressuspensas em 500 µL PBS 1 X e novamente centrifugada em 460 x g por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 200 µL de PBS e deixadas em gelo até a aquisição das amostras no equipamento FACSVerse. Para as células infectadas com DENV, as células foram fixadas com *Cytofix* (BD Biosciences) por 20 minutos, seguidas de três lavagens de 0,5 mL com *Permwash* (BD Biosciences). As células foram centrifugadas a 460 x g por cinco minutos a 4 °C e incubadas com anticorpo primário 4G2, anticorpo contra proteína de envelope de Flavivírus (diluição 1:400) e mantidos por 40 minutos a 4 °C. Uma nova lavagem de 0,5 mL com *Permwash* (BD Biosciences) seguida de centrifugação de 460 x g por cinco minutos a 4 °C. Após a retirada do sobrenadante, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário *Alexa Fluor 488 rabbit anti mouse IgG* (Molecular Probes – Thermo Fisher Scientific; diluição 1:500) por 40 minutos a 4 °C, seguida de lavagem com 0,5 mL com *Permwash* (BD Biosciences) e centrifugação a 460 x g por cinco minutos a 4 °C. Ao final as células foram ressuspensas em 500 µL de *FACS buffer* (Tampão fosfato salino – PBS – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4; SFB 1 %). As células foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS Verse (BD Biosciences) e analisadas no software *FlowJo-VX*. Para a técnica de *Sorting*, foi utilizado o equipamento FACS Melody (BD Biosciences).

3.4.6.1. *Phosflow*

Após os experimentos de ensaio de formação de placa, as células foram destacadas da placa com o auxílio de tripsina 0,05 %

(Thermo Fisher Scientific), transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugadas a 460 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 50 µL de tampão *Cytofix* (BioLegend, San Diego, CA, EUA) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Foram adicionados 1mL de tampão FACS e as amostras foram centrifugadas a 460 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi drenado e adicionou-se 1 mL de solução de permeabilização (85 % metanol; PBS) gelado. As amostras foram mantidas em gelo por uma hora e após a centrifugação, lavadas três vezes com PBS e incubadas por uma hora com os anticorpos de detecção NFκB p65 (Cell Signaling; diluição 1:10) ou pSTAT1 (Cell Signaling; diluição 1:10), seguidos de três lavagens com tampão FACS. As amostras foram ressuspensas em 500 µL de tampão FACS e adquiridas por citometria de fluxo no equipamento FACS Verse (BD Biosciences) e as análises foram realizadas utilizando o software *FlowJo-VX*.

3.5. Quantificações de imagem

As quantificações de área de infecção e número de células foram feitas com o auxílio do software *ImageJ-NIH*. Para isso, as determinações de área de infecção foram feitas a partir das células positivas para as infecções virais (campo GFP). O número de células foi determinado pelo número de núcleos presentes nas áreas de infecção, marcados com DAPI. A diferenciação de células selvagens foi feita a partir da positividade das células para a proteína fluorescente *mCherry*.

3.6. Análise estatística

Os resultados foram representados com média \pm desvio padrão. Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se *teste-t de Student* com correção *Welch's* quando necessário. As análises foram feitas com auxílio do programa *GraphPad-Prism 6.00* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, EUA) e consideradas estatisticamente significantes as diferenças que apresentarem valores de p igual ou menor que 0,05.

4. RESULTADOS

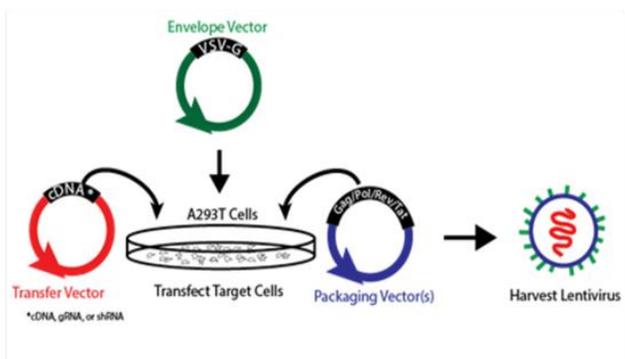
4.1. Produção de células A549-*mCherry*

Com a finalidade de identificar as células selvagens em experimentos de cultura mista com células IFNAR1-KO, foi produzido células da linhagem A549-*mCherry* que contem a proteína fluorescente *mCherry*, capaz de ser detectada por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Para isso, foram produzidos vetores lentivírus *mCherry*-puro (Figura 4, A e B) e após 48 horas da transdução das células A549 (Figura 4C), a cultura foi selecionada com o antibiótico puromicina, que além de selecionar as células que receberam o vetor lentiviral, também estimula a produção da proteína fluorescente *mCherry*.

A



B



C

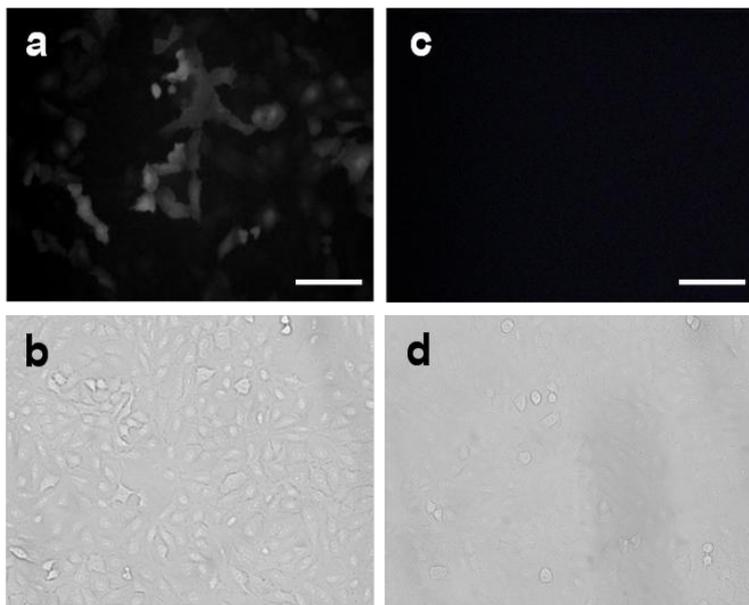


Figura 4: Produção de células A549-*mCherry*. Estabelecimento de uma linhagem celular derivada as células A549 com a produção estável da proteína fluorescente *mCherry*. (A). Representação gráfica do cassette de expressão do vetor *pCDHCMVmCherryT2Apuro*, constituído pelo promotor CMV, sequência para a codificação da proteína *mCherry*, conector T2A e gene de resistência a puromicina. (B). Esquema representativo da produção de vetores lentivirais. (C). Imagem de fluorescência das células A549-*mCherry* visualizadas ao microscópio após 48 horas de transdução das células, anterior ao início da seleção com o antibiótico puromicina. Em (a) células que foram transduzidas, em (c) células controle, sem a transdução do lentivírus *mCherry*-puro e fotos dos respectivos grupos em campo claro em (b) e (d).

Estabelecida a cultura A549-*mCherry*, foram realizados experimentos de cultura mista, com a finalidade de averiguar o poder discriminatório de células *mCherry* positivas na presença de células não marcadas. Desta forma, a cultura mista na proporção 1:1 foi infectada com o vírus VSVeGFP na MOI 0,0001 e mantida em meio semissólido com CMC. Após o período de 16 horas, as células foram fixadas e contracoradas com DAPI (Figura 5A – a, e i). É possível fazer a distinção de células A549 marcadas e não marcadas no filtro do vermelho (Figura 5A – b,f e j). Quando foram feitas as sobreposições das imagens positivas para o VSV (Figura 5A – c, g e k), é possível fazer a distinção entre as células *mCherry* positiva e negativas (Figura 5A – d, h e l). Para confirmar os dados foi utilizada a citometria de fluxo, após o cultivo da cultura mista nas proporções em percentagem 100 /0, 25 /75, 50 /50 nos tempos zero, 24 e 48 horas. As células foram adquiridas por citometria de fluxo e foi possível fazer a distinção de duas populações de intensidade de fluorescência distintas (Figura 5B).

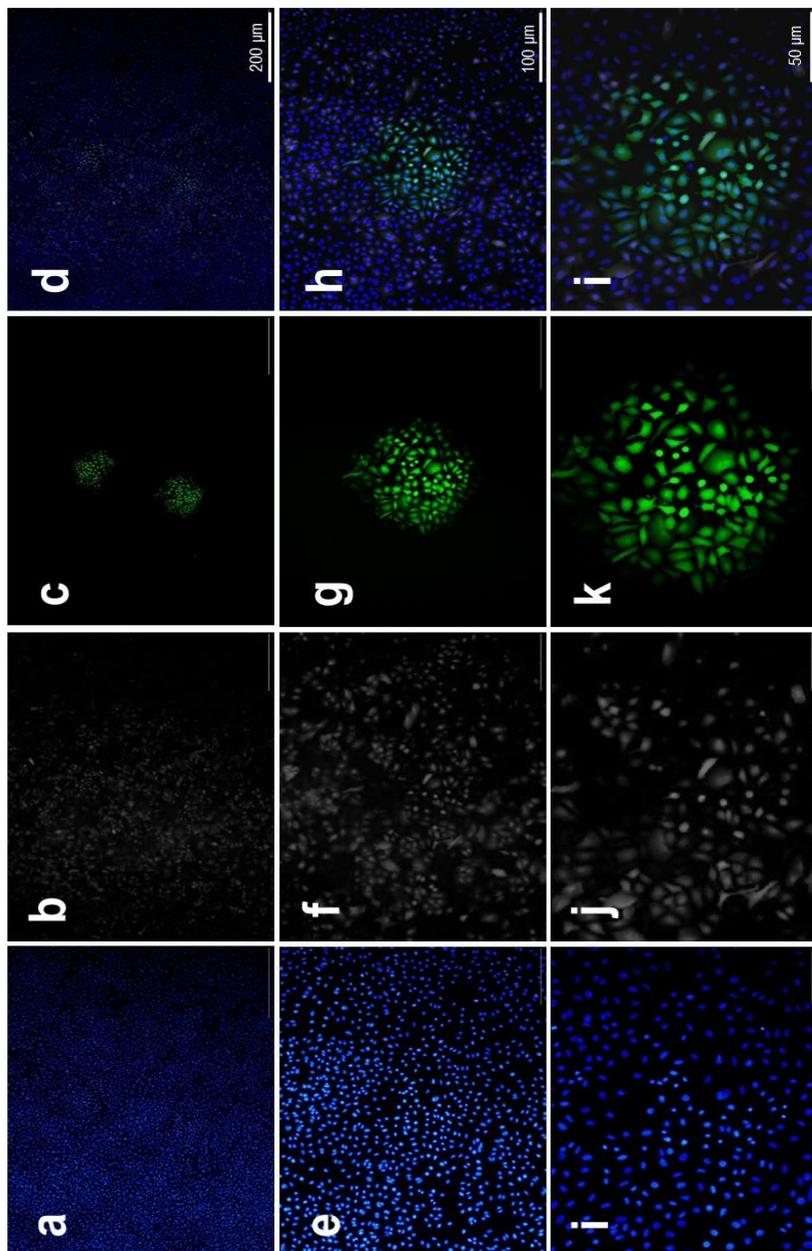


Figura 5A: Caracterização da linhagem A549-*mCherry*. Diferenciação de células A549-*mCherry* em cultura mista com células não marcadas. Imagens de

fluorescência de cultura mista de células infectadas com o vírus VSVeGFP nos aumentos de 10 X (a – d), 20 X (e – h) e 40 X (i – l). O núcleo está corado com DAPI (imagens a, e e i), as células positivas para a proteína *mCherry* são visualizadas no campo do vermelho (imagens b, f e j). As células infectadas são visualizadas no campo do verde (imagens c, g e k) e a sobreposição dos campos apresentadas nas imagens d, h e l.

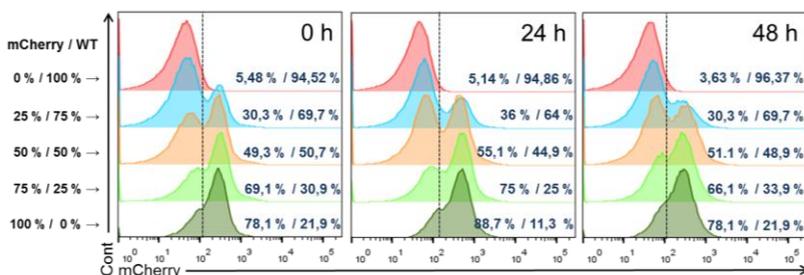


Figura 5B: Caracterização da linhagem A549-*mCherry*. Diferenciação de células A549-*mCherry* em cultura mista com células não marcadas. Diferenciação de cultura mista de A549-*mCherry* por citometria de fluxo. As células foram A549-*mCherry* foram cultivadas nas proporções de 100 %, 75 – 25% e 50 – 50 % com células não marcadas. A aquisição foi feita por citometria de fluxo nos tempo zero, 24 e 48 horas. As porcentagens de células *mCherry* positivas foram respectivamente: 0 h – 78,1 %, 69,1 %, 49,3 %, 30,2 % e 5,48 %; 24 h – 88,7 %, 75 %, 55,1 %, 36 % e 5,14 %; 48 h – 78,1 %, 66,1 %, 51,1 %, 30,3 % e 3,63%. As imagens representam gráficos de histograma dos tempos analisados, com a sobreposição das intensidades de fluorescências das diferentes proporções celulares.

Dessa forma, é possível fazer a distinção de células A549-*mCherry* pelas principais técnicas de detecção utilizadas neste trabalho.

4.2. Produção de células A549-IFNAR1-KO

A fim de produzir uma linhagem IFNAR1-KO, células da linhagem A549 foram transfectadas com os vetores da empresa *Horizon* (Figura 6A – a). Esses vetores contêm o cassete de expressão para a Cas9 e os guias para a edição gênica. Após a transfecção das células, foi feita a diluição limitante, expansão clonal e análise dos clones com

técnicas que visavam analisar o genótipo e o fenótipo desses clones (Figura 6A – b). A análise de genótipo foi realizada em cinco clones pela técnica de PCR. Na Figura 6B é possível fazer a discriminação das bandas dos clones IFNAR1-KO, de aproximadamente 187 pb, do controle sem modificação, de 290 pb.

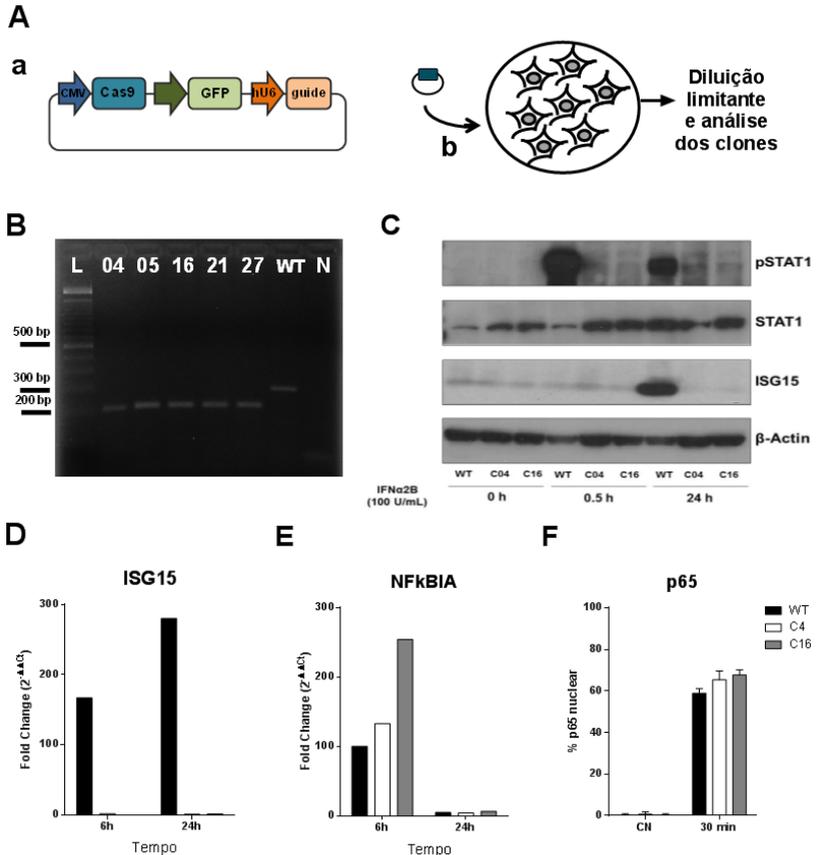


Figura 6: Produção de células A549-IFNAR1-KO. Produção de uma linhagem estável de células A549-IFNAR1-KO. (A). Modificação celular mediada pelo sistema CRISPR-Cas9. Em (a) representação gráfica dos principais constituintes dos vetores da Horizon para edição gênica e em (b) um esquema representativo das etapas de transfecção, expansão e análise dos clones IFNAR1-KO. (B). Genótipo dos clones IFNAR1-KO. Corrida eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR. Os fragmentos esperados possuem 290 pb (células selvagens) e 187 pb (clones

nocautes). *L.* Marcador de peso molecular GeneRuler. 4 – 27. Produto de PCR dos clones de 4 – 27. WT. Produto de PCR da célula parietal A549. *N.* Controle negativo da reação de PCR. (C). Gráfico de desvio padrão da média dos níveis de mRNA relativos de três experimentos independentes do gene ISG15 em células estimuladas com IFN α 2b nos tempos seis e 24 horas pós-estímulo. (D). Gráfico de desvio padrão da média da expressão relativa do gene NF κ BIA em células estimuladas com IL1 β nos tempos seis e 24 horas pós-estímulo. (E). *Western blotting* de células selvagens e IFNAR1-KO estimuladas com IFN α 2b nos tempos zero, 30 minutos e 24 horas para as proteínas pSTAT1, STAT1, ISG15 e beta-actina. F. Imunofluorescência para a proteína p65 de células estimuladas com IL1 β . Imagens adquiridas nos tempos zero e 30 minutos pós-estímulo.

A análise fenotípica foi realizada em níveis de: expressão gênica por RT-qPCR, expressão proteica por *western blotting* e avaliação de vias não relacionadas com IFN-I, por imunofluorescência de p65. Para a expressão gênica, dois clones de células A549-IFNAR1-KO foram cultivados, estimulados com IFN α 2b ou IL1 β pelo período de seis e 24 horas. Como controle foi utilizado células da linhagem A549 sem modificação, nas mesmas condições descritas anteriormente. Foram quantificados os níveis de mRNA dos genes 18S, como controle endógeno, dos genes ISG15, no grupo estimulado com IFN α 2b, e NF κ BIA, no grupo estimulado com IL1 β . Os gráficos da mediana dos experimentos estão apresentados nas Figuras 6C e 6D. É possível observar que os clones IFNAR1-KO não responderam ao estímulo de IFN α 2b, quando comparados com as células selvagens (Figura 6C), enquanto que responderam como esperado ao estímulo não relacionado à via do IFN-I, quando receberam IL1 β , com o aumento de NF κ BIA em seis horas e normalização em 24 horas pós-estímulo (Figura 6D).

Para a análise de expressão proteica, os clones de IFNAR1-KO foram cultivados e tratados com IFN α 2b. Com as amostras dos tempos analisados, foi feito um *western blotting* para a detecção das proteínas pSTAT1, como marcador de ativação celular via IFN-I, STAT1 total,

ISG15 como indicador de estímulo por IFN-I e beta-actina como controle de *loading* do gel. É possível observar (Figura 6E) que as células A549 selvagens são estimuladas com o IFN-I, pois nos tempos 30 minutos e 24 horas ocorreram a fosforilação de STAT1, uma leve diminuição de STAT1 total e a produção de ISG15 em 24 horas. Contudo, nos clones analisados não houve fosforilação e consumo de STAT1, além de não ter sido detectado o aumento na produção de ISG15 em 24 horas, sugerindo que os clones produzidos neste trabalho possuem uma deficiência na via do IFN-I.

Para a avaliação de uma via não relacionada com a do IFN-I, foi realizada a imunofluorescência para pNFκB após 30 minutos de estímulo com IL1β. Para isso, células A549 e A549-IFNAR1-KO foram cultivadas e estimuladas com IL1β pelo período de 30 minutos. Na Figura 6F é possível observar que no tempo zero encontra-se um número reduzido de p65 marcado nas células como um todo e que, após 30 minutos de estímulo, há a translocação de p65 para a região do núcleo, em todos os grupos, indicando que os clones de A549-IFNAR1-KO se comportam de maneira semelhante às células A549 selvagens. Dessa forma, como ambos os clones se comportaram de maneira semelhante, o clone 4 foi escolhido para ser utilizado no decorrer deste trabalho.

Para confirmar a ausência de resposta ao IFN-I as células foram estimuladas previamente à infecção com IFN-I e IFN-II e observadas quanto ao caráter protetor dessa estimulação. Para isso, células A549 selvagens e A549-IFNAR1-KO foram cultivadas, tratadas com IFNα2b (IFN-I) ou IFNγ (IFN-II) por 16 horas e posteriormente infectadas com os vírus DENV2, HSVeGFP, VACVeGFP na MOI 1 e VSVeGFP MOI

0,1, 0,01 e 0,001 respectivamente. Após o período de 16 horas, para o VSVeGFP e 36 horas para os demais vírus, o sobrenadante da cultura foi titulado (Figura 7 – C, E e G). A porcentagem de células infectadas foi determinada por citometria de fluxo (Figuras 7 – A, B, D e F). Como esperado, houve uma redução na porcentagem de células selvagens infectadas quando as mesmas foram tratadas com IFN-I.

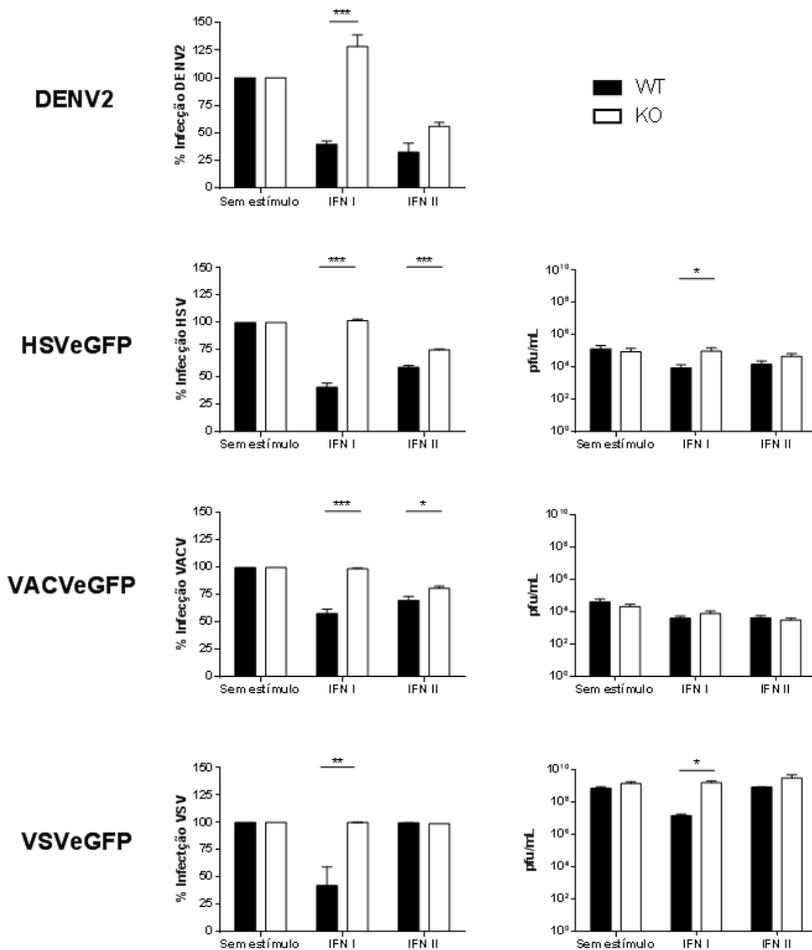


Figura 7: Proteção das células induzidas pelos IFN-I e IFN-II na infecção viral. Infecção de células A549 e A549-IFNAR1-KO após o estímulo de IFN-I e IFN-II (100 U/mL) por 16 horas. A porcentagem de células infectadas foi feita por citometria de fluxo e a quantificação da produção viral foi realizada por titulação do sobrenadante. (A) porcentagem de células positivas. (B) porcentagem de células positivas e (C) titulação da infecção com HSVeGFP MOI 1 por 36 horas. (D) porcentagem de células positivas e (E) titulação da infecção com VACVeGFP MOI 1 por 36 horas. (F) porcentagem de células positivas e (G) titulação da infecção com VSVeGFP MOI 0,01 por 16 horas.

Dessa forma, com esse conjunto de resultados, podemos concluir que a linhagem celular A549-IFNAR1-KO não responde ao IFN-I, sem o comprometimento de vias não relacionadas, e que a ausência do IFNAR1, nessas células é de crucial importância para a resposta celular contra vírus.

4.3. O impacto do IFNAR1 no espalhamento viral

Com o objetivo de avaliar o impacto do receptor do IFN-I durante a infecção viral, foram realizadas infecções em células A549, com vírus de diversas famílias. As quantificações de número de células infectadas e tamanho da área das placas virais foram realizadas por microscopia de fluorescência, e determinação de porcentagem de células respondedoras aos IFN-I, pela técnica de *phosflow*. Foram realizados experimentos de cultura mista de células A549 e A549-IFNAR1-KO, na proporção de 1:1, assim como grupos compostos inteiramente por células selvagem ou nocaute. As infecções foram realizadas com a MOI de 0,0001. Nos experimentos de microscopia de fluorescência as células eram cultivadas em meio semissólido contendo 3,2 % de CMC. Nos experimentos de citometria de fluxo as células foram cultivadas em

meio contendo 1% agarose. Todos os experimentos foram realizados três vezes.

Para as células infectadas com DENV (Figura 8) as análises foram feitas após 36 horas de infecção. É possível observar que a área da placa de infecção, correspondente às áreas verdes das Figuras 8A, 8B e 8C, aumenta de maneira crescente, como é possível observar nas quantificações do número de células infectadas por placa (Figura 8D) e a área de infecção (Figura 8E). No experimento de *phosflow* para pSTAT1 (Figura 8F), observamos que uma porcentagem inferior a 2 % de células respondem ao IFN produzido pela cultura celular durante a infecção.

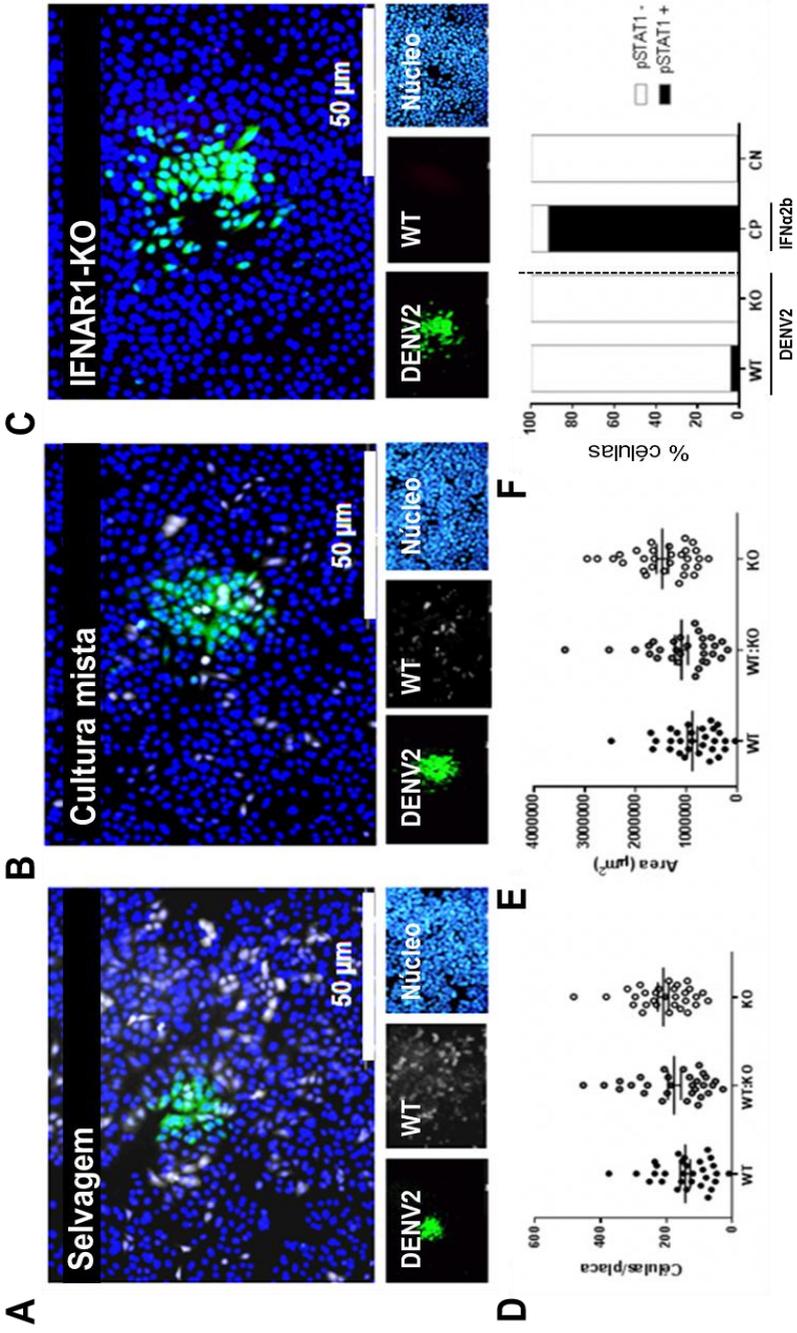


Figura 8: O impacto do IFNAR1 no espalhamento do vírus DENV2. Cultura de células em monocamada com meio semissólido e infectadas com DENV2 MOI 0,0001 por 36 horas. As células infectadas se apresentam na coloração verde, após a marcação do vírus com o anticorpo 4G2 e anticorpo secundário Alexa flúor 488. As células A549 estão positivas no filtro do vermelho, pela expressão da proteína fluorescente *mCherry*. Os núcleos das células são vistos no filtro azul, em virtude da contra marcação com o corante DAPI. (A). Células A549. (B). Cultura mista. (C). Células A549-IFNAR1-KO. As quantificações do número de células por placa de infecção (D) e área da placa (E) foram feitas no programa *ImageJ* e os gráficos gerado no programa *GraphPad Prism* 6. A quantificação da proteína pSTAT1 (F) foi realizada pela técnica de *phosflow*.

Nos experimentos envolvendo HSeGFP (Figura 9) as análises foram feitas após 24 horas de infecção. É possível observar que a área da placa de infecção, correspondente às áreas verdes das Figuras 9A, 9B e 9C, aumenta de maneira crescente e estatisticamente significativa entre os grupos experimentais com o aumento da proporção de células IFNAR1-KO presentes na cultura com o número de células infectadas por placa (Figura 9D) e na área de infecção (Figura 9E). No experimento de *phosflow* para pSTAT1 (Figura 9F), observamos que uma porcentagem inferior a 5 % de células respondem ao IFN produzido pela cultura celular durante a infecção.

Figura 9: O impacto do IFNAR1 no espalhamento do vírus HSVeGFP. Cultura de células em monocamada com meio semissólido e infectadas com HSVeGFP MOI 0,0001 por 24 horas. As células infectadas se apresentam na coloração verde. As células A549 estão positivas no filtro do vermelho, pela expressão da proteína fluorescente *mCherry*. Os núcleos das células são vistos no filtro azul, em virtude da contra marcação com o corante DAPI. (A). Células A549. (B). Cultura mista. (C). Células A549-IFNAR1-KO. As quantificações do número de células por placa de infecção (D) e área da placa (E) foram feitas no programa *ImageJ* e os gráficos gerado no programa *GraphPad Prism 6*. A quantificação da proteína pSTAT1 (F) foi realizada pela técnica de *phosflow*.

Nos experimentos com VACVeGFP (Figura 10), as análises foram feitas após 36 horas de infecção. A partir dos resultados obtidos, é possível observar que a área da placa de infecção, correspondente às áreas verdes das figuras 10A, 10B e 10C, aumenta de maneira crescente com o aumento da proporção de células IFNAR1-KO presentes na cultura, o número de células infectadas por placa (Figura 10D) e a área de infecção (Figura 10E) possuem um aumento, ambos estatisticamente significantes entre os grupos experimentais. No experimento de *phosflow* para pSTAT1 (Figura 10F), observamos que uma porcentagem inferior a 1 % de células respondem ao IFN produzido pela cultura celular durante a infecção.

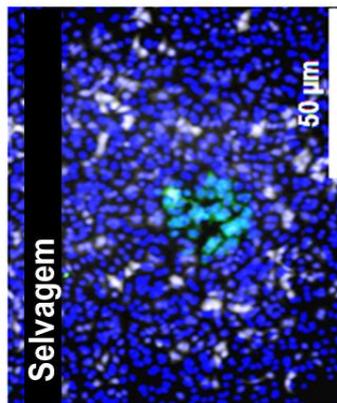
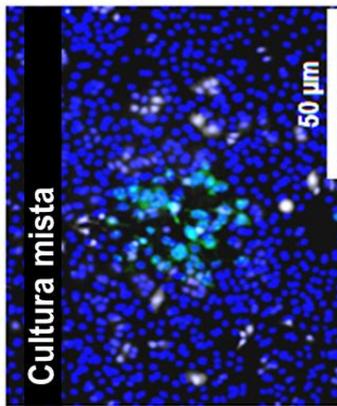
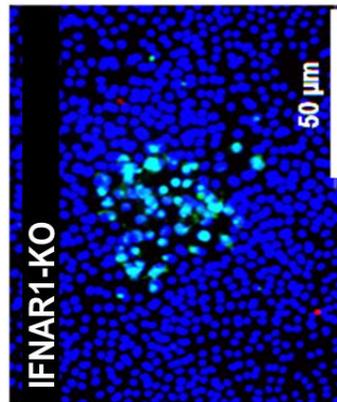
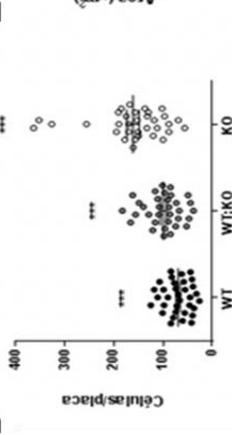
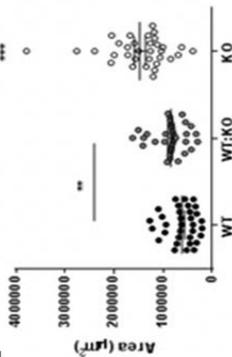
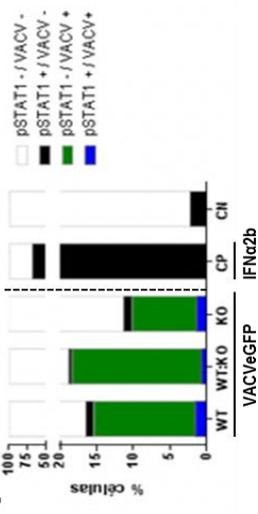
A**B****C****D****E****F**

Figura 10: O impacto do IFNAR1 no espalhamento do vírus VACVeGFP. Cultura de células em monocamada com meio semissólido e infectadas com VACVeGFP MOI 0,0001 por 36 horas. As células infectadas se apresentam na coloração verde. As células A549 estão positivas no filtro do vermelho, pela expressão da proteína fluorescente *mCherry*. Os núcleos das células são vistos no filtro azul, em virtude da contra marcação com o corante DAPI. (A). Células A549. (B). Cultura mista. (C). Células A549-IFNAR1-KO. As quantificações do número de células por placa de infecção (D) e área da placa (E) foram feitas no programa *ImageJ*. A quantificação da proteína pSTAT1 (F) foi realizada pela técnica de *phosflow*.

Os experimentos com VSVeGFP (Figura 11) foram analisados após 16 horas de infecção, no qual é possível observar que a área da placa de infecção, correspondente às áreas verdes das Figuras 11A, 11B e 11C, aumenta de maneira crescente com o aumento da proporção de células IFNAR1-KO presentes na cultura nos valores de número de células infectadas (Figura 11D) e por consequência na área da placa de infecção (Figura 11E). No experimento de *phosflow* para pSTAT1 (Figura 11F), observamos que uma porcentagem inferior a 2 % de células respondem ao IFN produzido pela cultura celular durante a infecção.

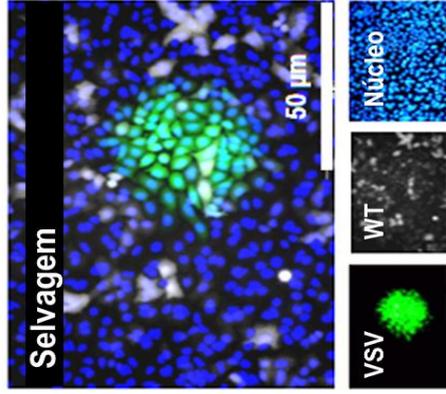
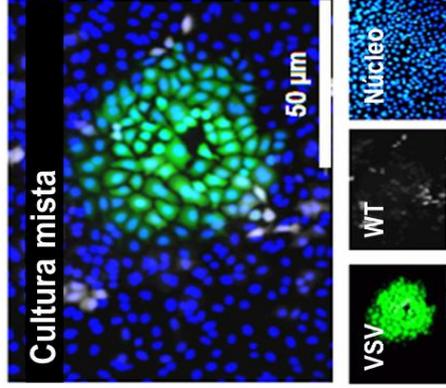
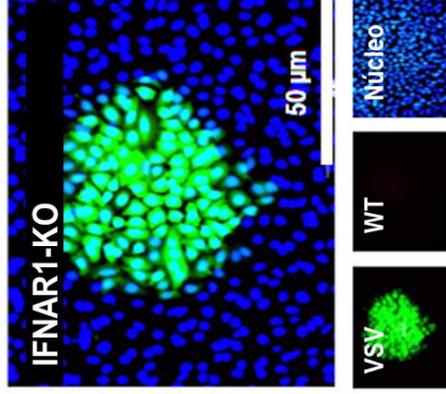
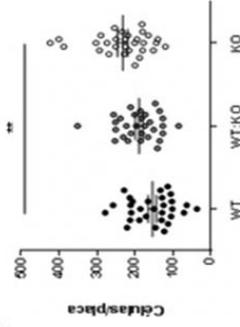
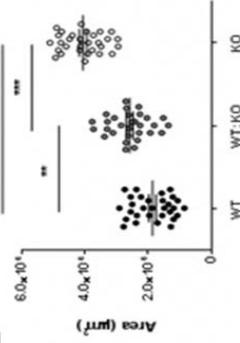
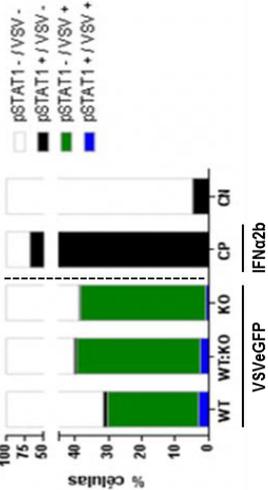
A**B****C****D****E****F**

Figura 11: O impacto do IFNAR1 no espalhamento do vírus VSVeGFP. Cultura de células em monocamada com meio semissólido e infectadas com VSVeGFP MOI 0,0001 por 16 horas. As células infectadas se apresentam na coloração verde. As células A549 estão positivas no filtro do vermelho, pela expressão da proteína fluorescente *mCherry*. Os núcleos das células são vistos no filtro azul, em virtude da contra marcação com o corante DAPI. (A). Células A549. (B). Cultura mista. (C). Células A549-IFNAR1-KO. As quantificações do número de células por placa de infecção (D) e área da placa (E) foram feitas no programa *ImageJ*. A quantificação da proteína pSTAT1 (F) foi realizada pela técnica de *phosflow*.

A ausência do IFNAR1 é crítica para a contenção do espalhamento viral, com base nos dados de células infectadas e quantificação de área. Contudo, os dados de pSTAT1 nos experimentos de placa indicam que cerca de 1 % das células infectadas respondem ao IFN durante a infecção. Além disso, na população de células não infectadas, o número de células pSTAT1 positivas também corresponde a menos que 1 % da população (Figuras 10F e 11F).

4.4. Ativação celular durante a infecção

Visto que o receptor de IFN-I se mostrou de fundamental importância para a contenção da infecção viral em todos os vírus analisados e que mesmo assim, um número inferior a 5 % das células, tanto infectadas quanto não infectadas, buscou investigar a resposta celular em nível de células individuais. Dessa forma, células da linhagem A549 selvagens foram infectadas com VSVeGFP, MOI 0,0001 por 18 horas e cultivadas na presença de meio semissólido. As células foram analisadas pela técnica de *phosflow* para as proteínas fosforiladas STAT1, p38 e TBK1 (Figura 12). As análises foram feitas nas populações de células não infectadas (Figura 12A, VSV-) e células infectadas (Figura 12A, VSV+).

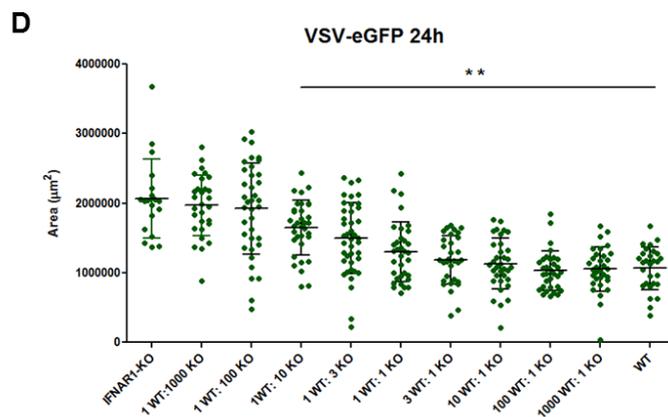
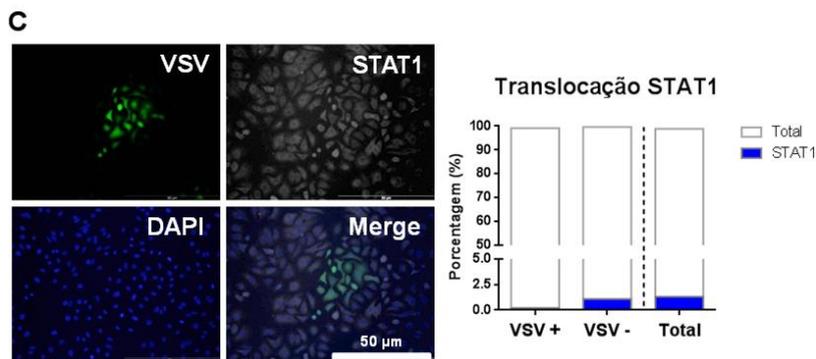
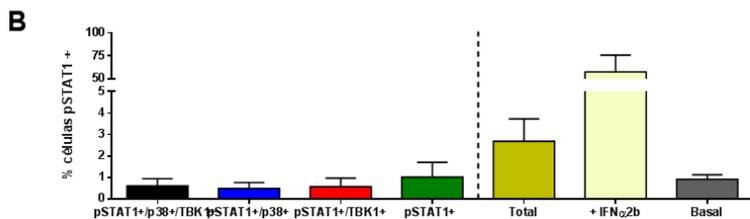
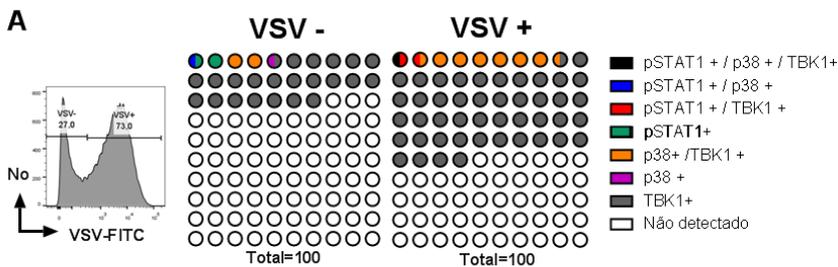


Figura 12: Phosflow da placa de infecção. Células A549 cultivadas em monocamada com meio semissólido e infectadas com VSVeGFP MOI 0,0001 por 18 h. (A). Análise das proteínas fosforiladas STAT1, p38 e TBK1 nas populações de células infectadas e não infectadas pela técnica de citometria de fluxo. (B). Gráfico de porcentagem das populações pSTAT1 positivas, somatório dos grupos pSTAT1 positivas (Total) e os controles (+IFN α 2b) células estimuladas com IFN α 2b (500 U/mL) e (Basal) células não estimuladas. (C). Imunofluorescência para STAT1 na placa de infecção por VSV. Contagem diferencial da translocação de STAT1 para o núcleo das células infectadas (VSV+), células não infectadas (VSV-) e o somatório de ambas as populações. (D). Cultura mista de células A549 e A549-IFNAR1-KO. As quantificações de área foram feitas no programa *ImageJ* e os gráficos gerado no programa *GraphPad Prism 6*.

Os dados sugerem que uma pequena porcentagem de células produz e responde ao IFN-I no decorrer da infecção (Figura 12A – células pSTAT1+/p38+/TBK1+). As células pSTAT1 positivas correspondem a uma parcela da população inferior a 2 % da células (Figura 12B). Na imunofluorescência da placa de infecção (Figura 12C) observou-se um resultado correspondente as técnicas de citometria de fluxo, onde poucas células possuem o translocamento de STAT1 para o núcleo e as células que apresentam a maior quantidade de STAT1 traslocado para a região nuclear se encontram da periferia da placa de infecção (Figuras 12C). Em experimentos de cultura mista de células A549 e A549-IFNAR1-KO foi observado uma diferença estatística a partir da diluição 1:10 (Figura 12D).

Visto que uma pequena parcela das células, tanto infectadas como não infectadas, respondem ao IFN produzido durante a infecção, foram realizados experimentos com o composto CBX, com o intuito de avaliar a importância da comunicação célula-célula durante a infecção. É possível observar que quando a comunicação das células foi interrompida, houve uma diminuição significativa no tamanho da placa de infecção nas células WT (Figura 13A) sem diferença significativa no

número de células infectadas por placa (Figura 13B), além da diminuição da fosforilação de STAT1 e da produção de ISG15 (Figura 13C). No experimento de *phosflow* (Figura 13D), os tratamentos com CBX apresentaram um leve aumento na expressão de pSTAT1 basal, contudo os grupos infectados com VSV apresentaram uma redução na fosforilação de STAT1, quando comparados com o grupo não tratado (Figura 13E), resultado que corrobora com os dados de *western blotting* (Figura 13C).

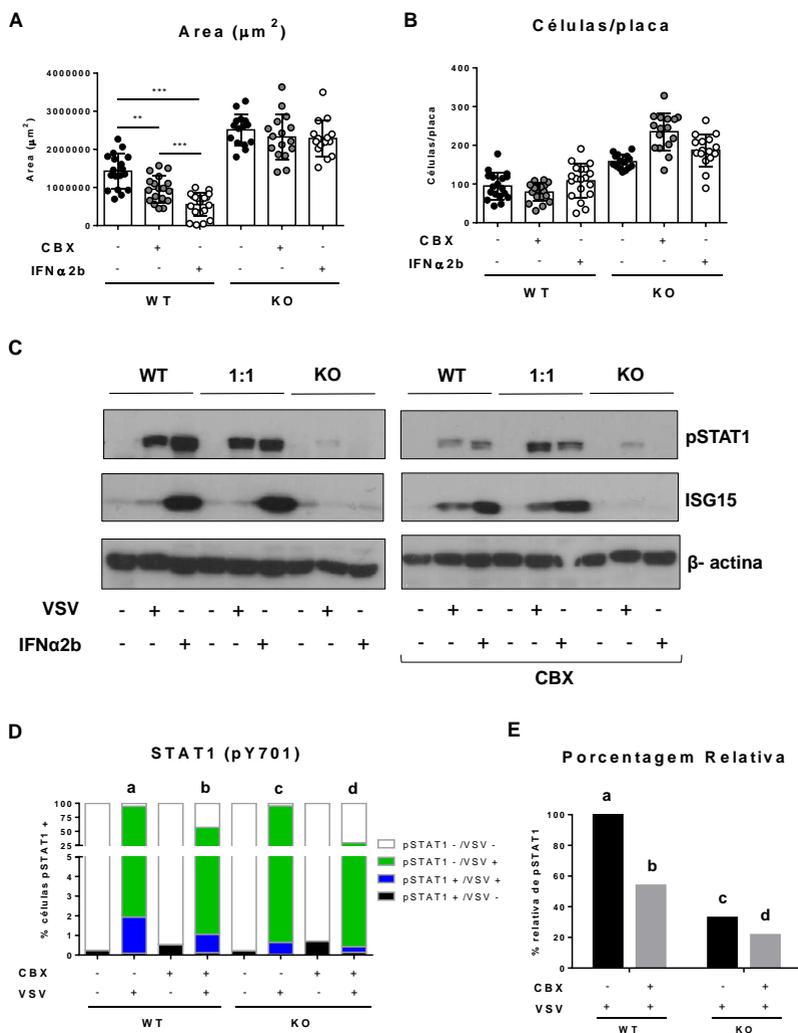


Figura 13: Bloqueio da comunicação entre as células. Experimentos com a presença do inibidor de *gap junction* CBX. As quantificações de área de placa de infecção (A) e número de células infectadas por placa (B) foram feitas no programa *ImageJ*. A determinação proteica foi feita com a técnica de *western blotting* (C) para as proteínas pSTAT1, ISG15 e beta-actina de células selvagens e IFNAR1-KO sem o tratamento com CBX e com o tratamento estimuladas com IFN α 2b ou infectadas com VSVeGFP MOI 0,0001 por 12 horas. A quantificação da proteína pSTAT1 em números absolutos (D) e em números relativos (E) foi realizada pela técnica de *phosflow*.

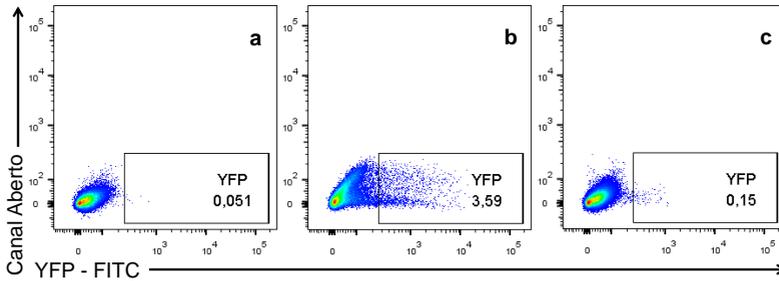
Dessa forma, esses conjuntos de resultados sugerem que a ativação de células por IFN-I contribui com a comunicação celular, o que proporciona uma resposta mais robusta contra agentes virais.

4.5. Expressão diferencial em células MEF durante a infecção

Com o objetivo de avaliar a resposta celular individual na disseminação viral em conjunto com a produção de IFN β , foram utilizadas células MEFs de camundongos C57bl/6 IFN β -YFP. Esses animais possuem após o término da região codificante do gene *ifnb*, a inserção da sequência de entrada interna de ribossomos (IRES) seguida à expressão do gene YFP (Sheu et al., 2008).

Para avaliar o melhor tempo de expressão tanto da proteína quanto de RNAm, células MEF foram estimuladas com *poly I:C* e quantificadas a expressão proteica de YFP por citometria de fluxo (Figura 14A) e transcrição por RT-qPCR (Figura 14B). Na Figura 14A é possível observar que a expressão de YFP é detectável pela técnica de citometria de fluxo, contudo sua expressão é inferior a 1 %. Em resultados prévios observou-se que o tempo de 12 horas pós-estímulo corresponde ao melhor tempo de expressão e detecção da proteína YFP. A análise dos níveis de transcritos (Figura 14B) apontou que a expressão de IFN-I acontece em ondas de expressão e que no tempo seis horas pós-estímulo corresponde ao ponto máximo de expressão.

A



B

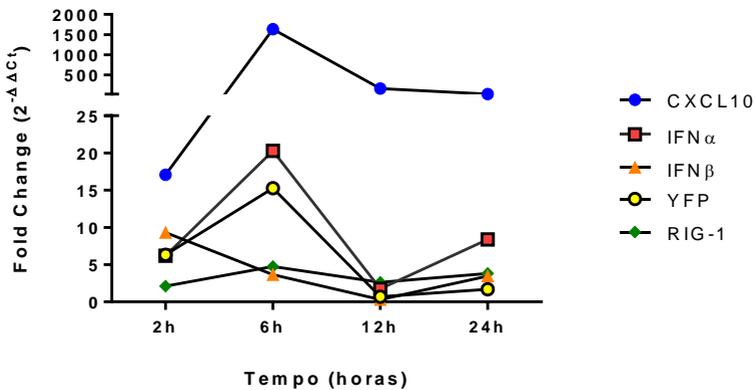


Figura 14: MEF estimuladas com *poly I:C*. Células MEF de animais C57b1/6 IFN β -YFP estimuladas com *poly I:C* (10 μ g/mL) por 12 horas. (A). *Dotplots* de citometria de fluxo de células MEF 12h pós-estímulo. Em (a) controle negativo, (b) controle de fluorescência, células transduzidas com AAV-YFP e (c) células estimuladas com *poly I:C*. (B). Gráfico de expressão relativa dos genes CXCL10, IFN α , IFN β , YFP e RIG-1.

Em um experimento preliminar, a fim de avaliar o impacto da expressão diferencial tanto de IFN β durante a infecção, células MEF foram infectadas com o vírus HSV $mCherry$, MOI 1 por 12 horas e separadas pela técnica de *Sorting*. As células foram separadas a partir da eliminação de debris celulares (Figura 15A) nas populações de células: infectadas, infectadas produtoras de IFN β , células não produtoras de

IFN β e não infectadas (*bystander*) e produtoras de IFN β (Figura 15B). Foram feitas as análises de expressão gênica (Figura 15C) tanto da população de células pré-*Sorting* quanto das células pós-*Sorting*.

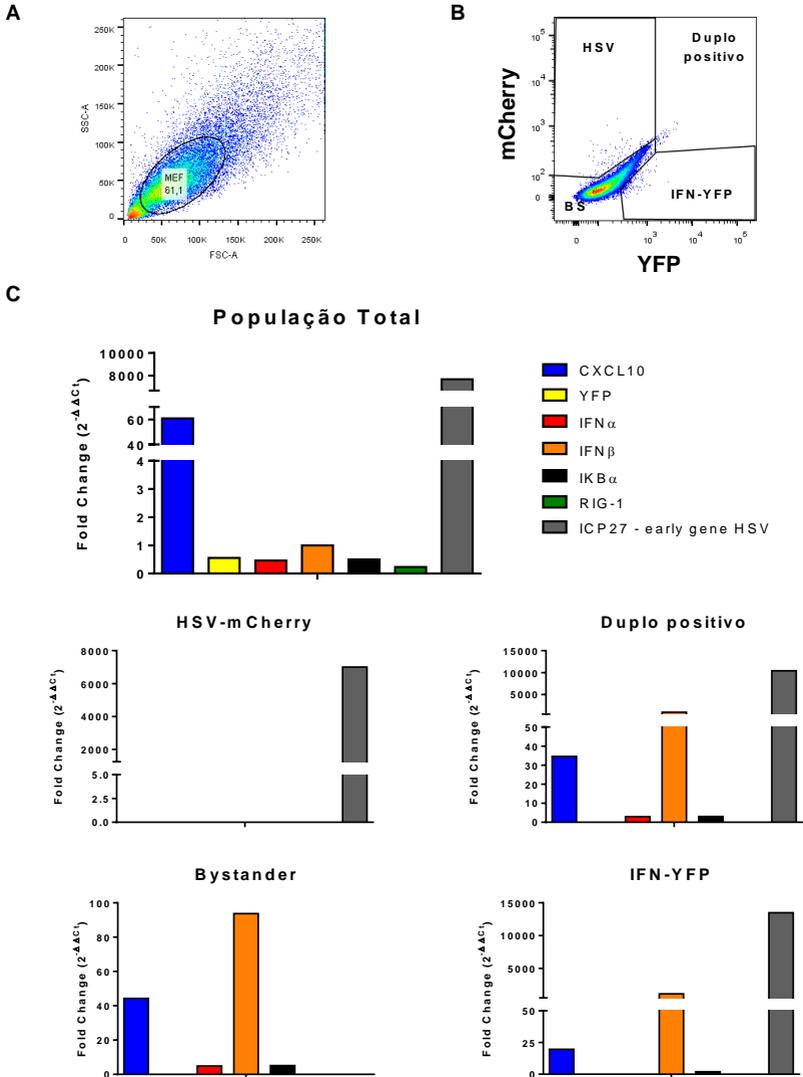


Figura 15: Expressão diferencial das populações de MEF. Análise de expressão gênica de células MEF de animais C57bl/6 IFN β -YFP infectadas com HSVmCherry

MOI 1 após 12 horas de infecção, após a separação por *Sorting* das populações: infectadas, infectadas produtoras de IFN β , *bystander* e produtoras de IFN β . As estratégias de *gating* para o *Sorting*, onde em (A) células separadas pela técnica e em (B) os grupos de células resultantes da separação. (C). Gráfico de expressão relativa dos genes CXCL10, YFP, IFN α , IFN β , IKB α , RIG-1 e ICP27 de células pré-*Sorting* (População total) e das populações pós-*Sorting*.

É possível observar que o perfil de expressão das células pré-*Sorting* se assemelha as células estimuladas com *poly I:C* (Figura 14B). Além disso, a expressão de IFN β ocorre de forma robusta nas populações YFP positivas, mas também presente na população *bystander* (Figura 14C). Os genes que indicam uma resposta celular, como CXCL10 e IKB α apresentaram uma expressão em todos os grupos, com exceção da população infectada. Além disso, não foi detectada a presença do vírus na população *bystander* pela expressão do gene ICP27.

5. DISCUSSÃO

A expressão de IFN-I corresponde à principal resposta contra uma infecção viral e visa a sua contenção e eliminação (Schoggins et al., 2011; Kaur e Plataniias, 2013; Warrick et al., 2016). A produção de IFN-I ocorre após a identificação de componentes virais por sensores celulares, que irão desencadear a ativação de fatores de transcrição que culminarão na produção do IFN (Maniatis et al., 1998; Apostolou e Thanos, 2008). De acordo com a literatura, os IFNs podem agir de forma autócrina ou parácrina e sua ação tem início com a ligação do IFN-I ao receptor de superfície IFNAR que desencadeia a produção de diversos mediadores químicos denominados ISGs, tendo início o estado antiviral (Schoggins et al., 2011; Kaur e Plataniias, 2013; Warrick et al., 2016). Todavia, as respostas celulares não são homogêneas e estão relacionadas a eventos probabilísticos de controle da expressão gênica e proteica, que podem determinar o curso de uma infecção (Apostolou e Thanos, 2008; Zhao et al., 2012; Cai et al., 2017; Drayman et al., 2017; Zanini et al., 2018). Com base no exposto, a hipótese desse trabalho é de que as células da periferia da placa possuem um papel fundamental na contenção das infecções virais. Sendo assim, este trabalho visa concatenar o sucesso de infecções virais de diferentes famílias com a interferência do IFN β na resposta durante a disseminação viral em cultura mista de células selvagem com células IFNAR1-KO. Em um trabalho publicado por Sheikh e colaboradores em 2014 o comportamento de macrófagos murinos IFNAR1-KO coincide com o de células IFN β -KO, o que justificaria sua utilização para o estudo de resposta ao IFN-I durante a infecção viral (Sheikh et al., 2014). Em

nosso trabalho, utilizamos famílias virais distintas com o objetivo de elucidar o papel da resposta celular independente dos mecanismos de evasão viral.

A fim de facilitar a discriminação entre células selvagens e IFNAR1-KO, em cultura mista, foram produzidas células que expressam de maneira constitutiva a proteína fluorescente *mCherry*. Este fluoróforo é oriundo da modificação da proteína fluorescente vermelha DsRed, isolada de *Discosoma* sp., constituída de um monômero com 236 aminoácidos e peso molecular de 28,8 KDa, com excitação em 587 nm e emissão em 610 nm (Shaner et al., 2004). A inserção da proteína *mCherry* foi feita pela transdução de células da linhagem celular A549 com o vetor lentiviral que codifica a proteína fluorescente seguido do gene de resistência ao antibiótico puromicina (Figura 4A). As células, após transdução (Figura 4C) e seleção, podem ser identificadas pelas técnicas de microscopia de fluorescência (Figura 5A) e citometria de fluxo (Figura 5B).

As modificações gênicas para a produção de uma linhagem celular IFNAR1-KO foram realizadas com o sistema CRISPR-Cas9. Primeiramente identificado em bactérias *Escherichia coli* em 1987, o sistema CRISPR-Cas9 teve sua função descrita em 2007 por Barrangou e colaboradores em *Streptococcus thermophilus* como um sistema similar à imunidade adaptativa em procarionotos, e atualmente é utilizado como uma eficiente ferramenta biotecnológica (Ishino et al., 1987; Barrangou et al., 2007; Ran et al., 2007; Gilbert et al., 2014; Nelles et al., 2016; Cai et al., 2017). O sistema CRISPR-Cas9 corresponde a uma nucleasse (Cas9) que promove a quebra da dupla fita de DNA guiada por uma sequência de RNA de simples fita composta por 20 nt (nucleotídeos),

dos quais possui uma região de reconhecimento da Cas9 denominada PAM (*Protospacer adjacent motif*).

Com a finalidade de produzir uma linhagem celular nocaute para IFNAR1, a linhagem celular A549 foi transfectada com os vetores doados pela empresa Horizon (Figura 6). No vetor estão presentes as sequências dos guias de sgRNA e a nuclease Cas9. Nesse experimento obteve-se uma taxa de eficiência de transfecção próxima a 50 % de células positivas para o gene repórter (dados não mostrados), percentual mínimo indicado pela empresa para dar continuidade aos experimentos de isolamento celular e expansão clonal.

Para garantir que a porção gênica que foi mantida no genoma não codifica para uma proteína funcional, realizamos a análise fenotípica dos clones nas etapas de análise de expressão gênica e proteica, mediante o estímulo celular gerado pela proteína IFN α 2b, funcionalidade de uma via não relacionada diretamente ao IFN-I, e a resposta na contenção da infecção pelos vírus DENV2, HSVeGFP, VACVeGFP e VSVeGFP (Figura 6).

No primeiro caso, determinamos a expressão do RNAm do gene ISG15, um ISG expresso mediante o estímulo de IFN-I (Platanias, 2005; Kaur e Platanias, 2013; Schneider et al., 2014). Para isso, dois clones foram estimulados com IFN α 2b por um período de seis e 24 horas, e foi determinada a expressão de ISG15 por RT-qPCR. Observa-se na Figura 5C que os clones não obtiveram expressão significativa de ISG15, quando comparados às células selvagens, fenótipo desejado para as células IFNAR1-KO. Na análise de uma via não relacionada diretamente a do IFN-I, após o estímulo com IL1 β , os clones IFNAR1-KO obtiveram valores de expressão de NFKBIA próximos aos das

células selvagens, nos tempo de seis e 24 horas pós-estímulo (Figura 6D).

Para confirmar os dados de RT-qPCR, os clones foram novamente estimulados com 100 U/mL de IFN α 2b e a partir do lisado celular avaliamos pela técnica de *western blotting* a expressão proteica das proteínas pSTAT1, STAT1 e ISG15 nos tempos 30 minutos e 24 horas pós-estímulo. Em comparação com as células selvagens, verificou-se que os clones IFNAR1-KO não foram estimulados com a presença do IFN-I. Não houve a detecção de pSTAT1 em 30 minutos e em 24 horas, diminuição de STAT1 total em 30 minutos e aumento de ISG15 em 24 horas, o que confirma que não houve a detecção do IFN-I pelos clones nocautes (Figura 6E). Para avaliar a via do NF κ B, observamos, por imunofluorescência, que os clones quando estimulados com IL1 β por 30 minutos obtiveram o mesmo perfil de translocação de p65 do citoplasma para o núcleo das células selvagens (Figura 6F). Com base nesse conjunto de resultados, e nas respostas semelhantes apresentadas por ambos os clones, determinamos que o clone utilizado no decorrer do trabalho seria o clone 4, denominado a partir deste momento com A549-IFNAR1-KO ou KO nas figuras.

Para avaliar a importância do IFNAR1 na resposta de defesa contra infecções virais, as linhagens celulares A549 e A549-IFNAR1-KO foram estimuladas com IFN α 2B que ativa as células via IFNAR, e IFN-II que utiliza o receptor IFNGR, previamente a infecção com os vírus de diferentes famílias. As infecções variaram entre si nos valores de MOI e tempo de infecção, visto que os vírus utilizados diferem entre si, o que gera uma evolução da infecção diferente para cada patógeno utilizado. O objetivo era mostrar o caráter protetor dos IFNs, ao impedir

a infecção viral e diminuir a produção de partículas virais. As avaliações de porcentagem de células infectadas foram feitas pela técnica de citometria de fluxo, enquanto a determinação da produção viral foi obtida através da titulação do sobrenadante das culturas.

Como esperado, observamos que as células A549 previamente estimuladas com IFN α 2b foram capazes de restringir a infecção por todos os vírus testados, quando comparadas com as células A549-IFNAR1-KO (Figura 7 – A,C,D e F). Além disso, o IFN α 2b reduziu, de maneira significativa, a produção de partículas virais infectantes dos vírus HSVeGFP (Figura 7D) e VSVeGFP (Figura 7G). Ao avaliarmos o espalhamento viral nas placas de infecção, fica claramente demonstrada a importância do IFNAR1 durante a infecção (Figuras 8 – 11). Chen e colaboradores, 2013 ao utilizarem camundongos IFNAR-KO identificaram uma persistência na infecção do vírus da hepatite B, quando comparados com animais selvagens, demonstrando a importância do receptor de IFN-I durante uma infecção viral (Chen et al., 2013).

Por conseguinte, com o objetivo de avaliar a resposta celular em nível de células individuais durante a infecção, foram realizados experimentos de *phosflow* de células infectadas cultivadas em meio semissólido (Figura 12A). Nesses experimentos foram utilizados o vírus VSVeGFP como modelo, em virtude da rápida evolução da infecção. No grupo VSV+, os dados de marcação tripla (Figura 12A – pSTAT1+/p38+/TBK1+) sugerem que uma pequena porcentagem de células produz e responde ao IFN-I durante a infecção viral, resultado que vai contra a nossa hipótese inicial. Contudo, curiosamente ao dividirmos as análises nos grupos VSV- e VSV+ observa-se que em

ambos os grupos a presença de células pSTAT1 é inferior a 2 % (Figura 12A e 12B), indicativo de que uma pequena porcentagem de células respondem aos IFNs-I produzidos durante a infecção.

A imunofluorescência para STAT1 total (Figura 12C) confirma a baixa porcentagem de células pSTAT1 tanto infectadas, quanto não infectadas. Em comparação as células estimuladas com IFN-I, observa-se um pequeno número de células que apresentam o translocamento de STAT1 para o núcleo. Apesar de sabermos que a resposta das células ocorre de maneira dinâmica, e que os dados correspondem à representação da resposta celular no instante avaliado, esse conjunto de dados sugere que a resposta celular é amplificada para células vizinhas. Além disso, os dados de cultura mista de células A549 e A549-IFNAR1-KO (Figura 12D) sugerem que na presença de uma célula respondedora de IFN é capaz de interferir na área da placa de infecção.

Para avaliar a contribuição da comunicação célula-célula na resposta antiviral, foram feitos experimentos com células tratadas com o composto carbenoxolone (CBX). O CBX interage com proteínas de conexão celular, impedindo a formação de canais via *gap-junctions* sem interferir na síntese de RNA e proteínas virais (Laird, 2006; Ablaser et al., 2013; Tonkin et al., 2015; Pu et al., 2017). Dessa forma, células da linhagem células A549 e A549-IFNAR1-KO foram previamente tratadas com CBX e posteriormente infectadas com VSVeGFP (Figura 13).

Foi possível observar que as células selvagens tratadas com CBX obtiveram uma redução significativa na área de infecção com VSVeGFP quando comparadas com o controle (Figura 13A) e diminuição na porcentagem de células infectadas (Figura 13D). Além

disso, houve diminuição de pSTAT1 detectada tanto por *western blotting* (Figura 13C) quanto por citometria de fluxo, quando analisados em números absolutos (Figura 13D) e em porcentagem relativa (Figura 13E). À vista disso, esse conjunto dados sugere que a junção entre as células funcione como um amplificador da resposta antiviral. Ablasser e colaboradores, 2013 demonstraram que entre os *gap-junctions* é possível a passagem de segundo mensageiros como cGAMP (Ablaser et. al., 2013). Contudo, Pu e colaboradores, 2017 ao demonstrarem que o tratamento com CBX não interfere na síntese de material gênico e proteínas virais de DENV1 e DENV2, sugerindo que o mecanismo de ação da diminuição da progênie viral estaria relacionado com a formação do envelope viral (Pu et al., 2017). Dessa forma, experimentos adicionais, que não envolvam fármacos que agem sobre a membrana celular precisam ser realizados, para validar a hipótese de que a ativação de células por IFN-I contribui com a comunicação celular. Além disso, um limitante desse conjunto de experimentos é o fato de que as células IFNAR1-KO quando infectadas tendem a se destacar da placa com o decorrer da infecção. Sendo assim, os valores de infecção para os grupos nocautes tendem a ser subestimados (Figuras 10F, 11F, 13D e 13E).

A fim de avaliar o impacto da expressão diferencial de IFN β durante a infecção, foi realizado um experimento preliminar de infecção de MEF de camundongos C57bl/6 IFN β -YFP (Sheu et al., 2008). Esses animais apresentam a sequência codificante do gene *ifnb*, a sequência IRES seguidos do gene YFP, o que permite acompanhar a produção de IFN β de forma indireta (Zhao et al., 2012). A avaliação da expressão gênica foi realizada após a separação das células em quatro populações: infectadas, infectadas produtoras de IFN β , *bystander* e produtoras de

IFN β (Figura 15). Para isso, foi estabelecido pela técnica de citometria de fluxo o melhor tempo de detecção da proteína YFP após o estímulo com *poly I:C*, o que mimetizaria uma infecção viral (Figura 14A). Ademais, foi determinada a dinâmica de expressão gênica das células no decorrer do tempo após o estímulo com *poly I:C*, afim de determinar o perfil de resposta celular global (Figura 14B). Como resultado, temos que entre os tempos de duas a seis horas corre o pico de expressão dos IFNs-I (Figura 14B). Estudos anteriores confirmam esse dado, onde o primeiro IFN a ser produzido é o IFN β , seguido da produção dos outros IFNs e sua gradual diminuição, em virtude da indução da transcrição de ISGs, entre elas as de regulação negativa da via (Sheikh et al., 2014; Schneider et al., 2014; McNab et al., 2015). Contudo, optamos por avaliar a expressão de maneira diferencial no tempo 12 horas pós-infecção, visto que só conseguimos fazer a separação entre as populações que expressão IFN β a partir da detecção da proteína YFP.

Trabalhos como o de Patil e colaboradores, 2015 ao realizarem experimentos com células únicas mostram que um pequeno número de células produz grandes quantidades de IFN (Patil et al., 2015). Nossos dados de citometria de fluxo (Figuras 14A e 15) corroboraram com os dados da literatura, onde mostram que um pequeno número de células é responsável pela produção de IFN β (Patil et al., 2015; Voigt e Yin, 2015). Os dados de expressão gênica da população total se assemelhou aos dados de células estimuladas com *poly I:C* (Figura 15B). Há a necessidade de novos experimentos de *Sorting* para determinarmos a dinâmica de resposta celular durante a infecção.

Sendo assim, a partir dos resultados obtidos até o presente momento, concluímos que as células da periferia da placa parecem ser

as responsáveis pela contenção do espalhamento viral. A resposta antiviral é amplificada com a comunicação célula-célula, visto que uma pequena porcentagem de células é responsável pela produção de IFN-I. Além disso, possivelmente a comunicação celular participe na amplificação de resposta desse mediador químico.

6. CONCLUSÃO

A partir do exposto, concluímos que as células infectadas parecem não conseguir responder em tempo hábil ao IFN no decorrer da infecção viral, e que a ação parácrina das células da periferia da placa possui uma maior relevância na contenção viral. Foi possível, dentro das limitações, avaliar o impacto da resposta celular individual no espalhamento de diferentes vírus e a interferência da produção e resposta do IFN β no decorrer da infecção. Até o presente momento, conseguimos produzir ferramentas que serão utilizadas em outros trabalhos, como as linhagens de células A549-*mCherry* e A549-IFNAR1-KO. Entretanto, ainda não obtivemos ferramentas capazes de mostrar a produção de IFN β na mesma célula respondedora (Apêndice). Contudo, considerando o baixo número de células produtoras de IFN e os dados de STAT1 fosforilado produzidos pelas células infectadas, acrescentado aos dados de *phosflow* da placa de infecção, demonstra-se que a ação parácrina dos IFN-I possui um papel mais relevante no controle do espalhamento viral, visto que pequenas quantidades de IFN-I são suficientes para conter a infecção. Nossos dados também sugerem que a comunicação entre as células contribui para a resposta antiviral, visto que um pequeno número de células produzem IFN-I e que poucas células são pSTAT1 positivas durante a infecção viral. Esses eventos sugerem que há uma amplificação de sinal dependente de contato celular.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas do trabalho é preciso repetir o experimento de *Sorting* com as células MEFs das populações de células infectadas, infectadas produtoras de IFN β , *bystander* e produtoras de IFN β no decorrer da infecção viral. No que diz respeito à contribuição da comunicação celular, experimentos adicionais serão realizados para definirmos o papel da ação parácrina durante as respostas antivirais, além da localização na placa de infecção das células respondedoras aos IFN-I. Além disso, a literatura reporta que a condição inicial da célula é crucial para determinar a evolução da infecção. Dessa forma, experimentos de determinação inicial de ISGs e evolução da infecção devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- ABE, T., BARBER, G.N. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF- κ B activation through TBK1. **J Virol.** 2014May;88(10):5328-41.
- ABLASSER, A. et al. Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. **Nature.** 2013 Nov 28;503(7477):530-4.
- ABRAHAM, G., BANERJEE, A.K. Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus. **Proc Natl Acad Sci.** 1976 73:1504–1508.
- AKIRA, S., UEMATSU, S., TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell.** 2006 Feb 24;124(4):783-801.
- ALBERTINI, A.A. et al. Crystal structure of the rabies virus Nucleoprotein-RNA complex. **Science.** 2006 313:360–363.
- ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature.** 2001 413, 732–738.
- APOSTOLOU, E., THANOS, D. Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. **Cell.** 2008 Jul 11;134(1):85-96.
- ARRIBAS, M. et al., Differences in adaptive dynamics determine the success of virus variants that propagate together. **Virus Evol.** 2018 Jan 9;4(1):vex043.
- BARBER, G.N. VSV-tumor selective replication and protein translation. **Oncogene.** 2005 Nov 21;24(52):7710-9.
- BARRANGOU, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science.** 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.
- BALTIMORE, D. Expression of animal virus genomes. **Bacteriol Rev.** 1971 35 (3): 235–41.
- BARTON, G.M., KAGAN, J.C., e MEDZHITOV, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. **Nat. Immunol.** 2016 7, 49–56.
- BASAK, S. et al. Reviewing Chandipura: A Vesiculovirus in human epidemics. **Biosci. Rep.** 2007 27 275–298

- BEVIS, B.J., GLICK, B.S. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). **Nat Biotechnol.** 2002 Jan;20(1):83-7.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature.** 2013;496:504–7.
- CAI, C. et al. Integrated modeling and analysis of intracellular and intercellular mechanisms in shaping the interferon response to viral infection. **PLoS One.** 2017 Oct 11;12(10):e0186105.
- CHEN, M.F. et al. Establishment and application of hepatitis B virus persistent replication model in IFNAR(-/-) mouse. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.** 2013 Jun;33(3):392-7.
- CONDIT, R.C., MOUSSATCHE, N., TRAKTMAN, P. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. **Adv.Virus Res.** 2006 66: 31-124.
- CROZAT, K. e BEUTLER, B. TLR7: A new sensor of viral infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2004 101, 6835–6836.
- DARNELL, J.E., KERR, I.M. e STARK, G.R. Jak–STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular proteins. **Science.** 1994 264, 1415–1420.
- DRAYMAN, N. et al., 2017. Dynamic Proteomics of Herpes Simplex Virus Infection. **MBio.** 2017 Nov 7;8(6). pii: e01612-17.
- DOLASIA, K. et al. TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity. **Int Rev Immunol.** 2017 Dec 1:1-17
- ELDE, N.C., MALIK, H.S. The evolutionary conundrum of pathogen mimicry. **Nat Rev Microbiol.** 2009 Nov;7(11):787-97.
- ELLIOTT, G., O'HARE, P. Live-cell analysis of a green fluorescent protein-tagged herpes simplex virus infection. **J Virol.** 1999 May;73(5):4110-9.
- FENNER, F. et al. Smallpox and its Eradication. **Geneva: World Health Organisation.** 1988.
- FERGUSON, B.J. et al. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. **Elife.** 2012;1:e00047.
- GIARD, D.J. et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. **J Natl Cancer Inst.** 1973 Nov;51(5):1417-23.

- GIBERT, L.A. et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. **Cell**. 2014 Oct 23;159(3):647-61.
- GRAHAM, F.L. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J Gen Virol**. 1977 Jul;36(1):59-74.
- GREEN A. M., BEATTY R.P., HADJILAOU A., HARRIS E. Innate Immunity to Dengue Virus Infection and Subversion of Antiviral Responses. **National Institutes of Health**, v. 426, n. 6, p. 1148-1160, mar. 2015.
- GURTU, V., YAN, G., ZHANG, G. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**. 1996 Dec 4;229(1):295-8.
- HENAO-RESTREPO, A.M. et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). **Lancet**. 2017 Feb 4;389(10068):505-518.
- HOLLINSHEAD, M. et al. Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane. **J.Virol**. 1999 73, 1503-1517.
- HONDA, K. et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. **Nature**. 2005 434, 1035–1040.
- HONDA, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature**. 2005b 434, 772–777.
- HOSHINO, K. et al. IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. **Nature**. 2006 440, 949–953.
- HU, J. et al. Chromosome-specific and noisy IFNB1 transcription in individual virus-infected human primary dendritic cells. **Nucleic Acids Res**. 2007;35(15):5232-41.
- HUSAIN, M., MOSS, B. Vaccinia virus F13L protein with a conserved phospholipase catalytic motif induces colocalization of the B5R envelope glycoprotein in post-Golgi vesicles. **J Virol**. 2001 Aug;75(16):7528-42.
- IHLE, J.N. et al. The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. **Adv. Immunol**. 1995 6, 1–35.
- ISSACS, A., LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**. 1957 Sep 12;147(927):258-67.

- ISHIKAWA, H. e BARBER, G.N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. **Nature**. 455, 674–678 (2008).
- ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **J Bacteriol**. 1987 Dec;169(12):5429-33.
- IWASAKI, A., MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**. 2010 Jan 15;327(5963):291-5.
- JANEWAY, C.A. Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**. 1989;54 Pt 1:1-13.
- JOZEF CZUK, J., DREWS, K., ADJAYE, J. Preparation of Mouse Embryonic Fibroblast Cells Suitable for Culturing Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. **J. Vis. Exp**. 2012 (64), e3854.
- KANG, D.C. et al. MDA-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002;99:637–642.
- KAUR, S., PLATANIAS, L.C. IFN- β -specific signaling via a unique IFNAR1 interaction. **Nat Immunol**. 2013 Sep;14(9):884-5.
- KATZ, J.B., et al. Comparative performance of four serodiagnostic procedures for detecting bovine and equine vesicular stomatitis virus antibodies. **J Vet Diagnostic Investigation**. 1997 9(3):329-331; 5.
- KIM, S. et al. Self-priming determines high type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells. **Eur J Immunol**. 2014 Mar;44(3):807-818.
- KORNFEIND, E.M., VISALLI, R.J. Human herpesvirus portal proteins: Structure, function, and antiviral prospects. **Rev Med Virol**. 2018 May;28(3):e1972.
- KUHN, R.J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**. 2002 108, 717–725.
- LEVY, D.E. et al. Synergistic interaction between interferon- α and interferon- γ through induced synthesis of one subunit of the transcription factor ISGF3. **EMBO**. 1990 J. 9, 1105–1111.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. 1951 Nov;193(1):265-75.

- LUPFER, C., KANNEGANTI, T.D. The expanding role of NLRs in antiviral immunity. **Immunol Rev.** 2013 Sep;255(1):13-24.
- MACPHERSON, I. The characteristics of animal cells transformed in vitro. **Adv Cancer Res.** 1970;13:169-215.
- MANIATIS, T. et al. Structure and function of the interferon beta enhanceosome. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** 1998 63, 609–620.
- MANSUR, D.S. et al. **Intracellular sensing of viral DNA by the innate immune system.** **Microbes Infect.** 2014 Dec;16(12):1002-12.
- MARIÉ, I., DURBIN, J.E., LEVY, D.E. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. **EMBO J.** 1998 Nov 16;17(22):6660-9.
- McFADDEN, G. Poxvirus tropism. **Nat Rev Microbiol.** 2005 Mar;3(3):201-13.
- McNAB, F. et al. Type I interferons in infectious disease. **Nat Rev Immunol.** 2015 Feb;15(2):87-103.
- NELLES, D.A. et al. Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9. **Cell.** 2016 Apr 7;165(2):488-96.
- NEWCOMB, W.W., HOMA, F.L., BROWN, J.C. Herpes simplex virus capsid structure: DNA packaging protein UL25 is located on the external surface of the capsid near the vertices. **J Virol.** 2006 Jul;80(13):6286-94.
- PATIL, S. et al. Single-cell analysis shows that paracrine signaling by first responder cells shapes the interferon- β response to viral infection. **Sci Signal.** 2015 Feb 10;8(363):ra16.
- PICHLMAIR, A., REIS e SOUSA, C. Innate recognition of viruses. **Immunity.** 2007 Sep;27(3):370-83.
- PLATANIAS, L.C. Mechanisms of type I and type-II-interferon-mediated signalling. **Nat Rev Immunol.** 2005 May;5(5):375-86.
- PU, J. et al. Antiviral activity of Carbenoxolone disodium against dengue virus infection. **J Med Virol.** 2017 Apr;89(4):571-581.
- ROTHMAN A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and cytokine storms. **Nature reviews.** Immunology, v. 11, n. 8, p. 532-543, ago. 2011.

- RÜCKERT, C., EBEL, G.D. How Do Virus - Mosquito Interactions Lead to Viral Emergence? **Trends Parasitol.** 2018 Jan 2. pii: S1471-4922(17)30306-9.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. Calcium - phosphate - mediated Transfection of Eukaryotic Cells with Plasmid DNAs. **CSH Protoc.** 2006 Jun 1;2006(1). pii: pdb.prot3871.
- SASAKI, K. et al. Studies on measles virus. II. Propagation in two established simian renal cell lines and development of a plaque assay. **Kitasato Arch. Exp. Med.** 1964, 37: 27-42.
- SCHEU, S., DRESING, P., LOCKSLEY, R.M. Visualization of IFN β production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008 Dec 23;105(51):20416-21.
- SCHOGGINS, J.W. et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. **Nature.** 2011 Apr 28;472(7344):481-5.
- SCHNEIDER, W.M., CHEVILLOTTE, M.D., RICE, C.M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. **Annu Rev Immunol.** 2014;32:513-45.
- SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nat Rev Immunol.** 2015 Dec;15(12):745-59.
- SECOMBES, C.J., ZOU, J. Evolution of Interferons and Interferon Receptors. **Front Immunol.** 2017 Mar 2;8:209.
- SHANER, N.C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. **Nat Biotechnol.** 2004 Dec;22 (12):1567-72.
- SHARP, P.M. Origins of human virus diversity. **Cell.** 2002 Feb 8;108(3):305-12.
- SHEIKH, F. et al. An essential role for IFN- β in the induction of IFN-stimulated gene expression by LPS in macrophages. **J Leukoc Biol.** 2014 Oct;96(4):591-600.
- SHIVKUMAR, M. et al. Herpes Simplex Virus 1 Interaction with Myeloid Cells *In Vivo*. **J Virol.** 2016 Oct 1; 90(19): 8661–8672.

- SIMMONS, C.P. et al. Therapeutics for dengue: recommendations for design and conduct of early-phase clinical trials. **PLoS Negl Trop Dis.** 2012; 6(9):e1752.
- SINGH, K.R.P. Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.). **Curr. Sci.**1967 36: 506-508.
- SMITH, G.L., TALBOT-COOPER, C., LU, Y. How Does Vaccinia Virus Interfere With Interferon? **Advances in Virus Research.** Available online 16 February 2018.
- STILLMAN, E.A., WHITT, M.A. Transcript initiation and 5'-end modifications are separable events during vesicular stomatitis virus transcription. **J Virol.** 1999 Sep;73(9):7199-209.
- SUN, L. et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. **Science.** 2013 339, 786–791.
- THANOS, D., MANIATIS, T. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. **Cell.** 1995 83, 1091–1100.
- THOMAS, D. et al. Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: scanning transmission electronmicroscopy analysis. **J Virol.** 1985 May;54(2):598-607.
- TOBER, R. et al. VSV-GP: a potent viral vaccine vector that boosts the immune response upon repeated applications. **J Virol.** 2014 May;88(9):4897-907.
- TOROPOVA, K. et al. The herpes simplex virus 1 UL17 protein is the second constituent of the capsid vertex-specific component required for DNA packaging and retention. **J Virol.** 2011 Aug;85(15):7513-22.
- TSUCHIYA, S. et al. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. **Cancer Res.** 1982 Apr;42(4):1530-6.
- UNTERHOLZNER, L. et al. Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds TBK1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. **PLoS Pathog.** 2011 Sep;7(9):e1002247.
- VOIGT, E.A., SWICK, A., YIN, J. Rapid induction and persistence of paracrine-induced cellular antiviral states arrest viral infection spread in A549 cells. **Virology.** 2016 Sep;496:59-66.

- VOIGT, E.A., YIN, J. Kinetic Differences and Synergistic Antiviral Effects Between Type I and Type III Interferon Signaling Indicate Pathway Independence. **J Interferon Cytokine Res.** 2015 Sep;35(9):734-47.
- WARRICK, J.W. et al. Tools for Single-Cell Kinetic Analysis of Virus-Host Interactions. **PLoS One.** 2016 Jan 11;11(1):e0145081.
- WU, J. et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. **Science.** 2013;339:826e30.
- YANG, H. et al. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. **Nat Protoc.** 2014 Aug;9(8):1956-68.
- YONEYAMA, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nat Immunol.** 2004 Jul;5(7):730-7.
- YONEYAMA, M. et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. **J Immunol.** 2005 Sep 1;175(5):2851-8.
- ZANINI, F. et al., 2018. Single-cell transcriptional dynamics of flavivirus infection. **Elife.** 2018 Feb 16;7. pii: e32942.
- ZHAO, M. et al. Stochastic expression of the interferon- β gene. **PLoS Biol.** 2012 Jan;10(1):e1001249.

APÊNDICE – Produção de células responsivas IFN β -DsRed

Construção dos vetores

Uma parte do trabalho correspondeu à produção de uma linhagem celular estável responsiva ao IFN. Para isso, seguida ao gene *IFNB* imediatamente anterior à região 3' UTR, foi elaborado um gene sintético, que contém uma entrada interna de ribossomos (IRES/ECMV - *Encephalomyocarditis virus*), seguido do gene para a codificação da proteína DsRed, com otimização de códons para a expressão em células de mamífero (Gurtu et al., 1996; Bevis e Glick, 2002). O elemento IRES permite a translocação do ribossomo na fita de RNAm, que possibilita a codificação de duas proteínas de forma independente (Gurtu et al., 1996). Além disso, nesse sistema a proteína DsRed funcionaria como um repórter para a expressão de IFN β , o que facilitaria sua detecção na cultura celular (Bevis e Glick, 2002).

A construção do gene sintético teve início com a montagem *in silico* das sequências IRES, DsRed e a inserção de 60 nt das porções finais da região codificante de IFN β na região anterior e região 3' UTR na porção final. Essa adição na sequência direciona a recombinação homóloga do gene sintético no genoma da célula receptora (Yang et al., 2014). Essa sequência final foi sintetizada pela empresa *GenScript* (*GenScript*, Piscataway, NJ, EUA) no vetor *pUC57* denominado *pDonor-DsRed* e os guias IFN β 1 e IFN β 2, para a abertura do genoma, foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Belo Horizonte, MG, Brasil) na forma de dois oligonucleotídeos complementares (Figura 16). Os vetores que continham o gene que

codifica para a Cas9, *pX330* (Addgene Plasmid #42230) e *pX459.V2* (Addgene Plasmid #62988) foram amplificados em bactérias *Escherichia coli* cepas Top10[®] e Stbl3. A produção em larga escala e purificação dos plasmídeos foi feita utilizando a coluna de cromatografia da *Qiagen* (*SABiosciences*, Hilden, NRW, Alemanha) enquanto que a purificação em pequena escala foi feita utilizando o *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega).



Figura 16: Células IFN-Ds-Red. Representação gráfica do genoma das células responsivas ao IFN.

O guia IFN β 1 para a edição do genoma foi clonado no vetor *pX330* e o guia IFN β 2 foi clonado no vetor *pX459.V2*. Para isso, ambos os vetores (10 μ g), de forma isolada, foram digeridos com a enzima *BbsI* *FastDigest* (10 unidades - *Fermentas*), com 3 μ L de *buffer FastDigest* 10 X (*Fermentas*) e água estéril, completando uma reação final de 30 μ L. Depois de homogeneizada, a amostra foi incubada a 37 $^{\circ}$ C por uma hora. A reação foi mantida por 20 minutos a 65 $^{\circ}$ C para a inativação da enzima e posteriormente submetida à corrida eletroforética em gel de agarose 1 % em tampão TBE, com a 90 V por uma hora. O gel foi corado com solução contendo brometo de etídio. Foi utilizado o marcador *GeneRuler* 1 kb (*Fermentas*) nessa eletroforese. As bandas de 8506 pb e 9170 pb referente aos vetores foram purificadas do gel utilizando-se o kit de extração *GE* (*General Electric Company*, Fairfield, CT, EUA) (Figura 17 e 18). A ligação foi realizada com a enzima *T4*

DNA ligase (Invitrogen) e obedeceu à proporção 1:3 (proporção em mol – vetor: inserto). O seu produto foi transformado em bactérias termocompetentes *Escherichia coli* cepa Top10f^r.

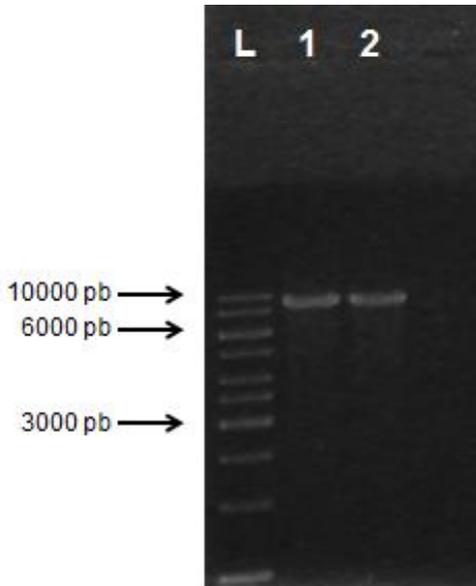


Figura 17: Digestão do vetor *pX330*. Eletroforese em gel de agarose 1 % do produto de digestão do vetor *pX330* com a enzima *BbsI*. L. Marcador de peso molecular *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder*. 1 e 2. Produto da digestão do vetor *pX330* com a enzima *BbsI*. Banda esperada de 8,5 kb.

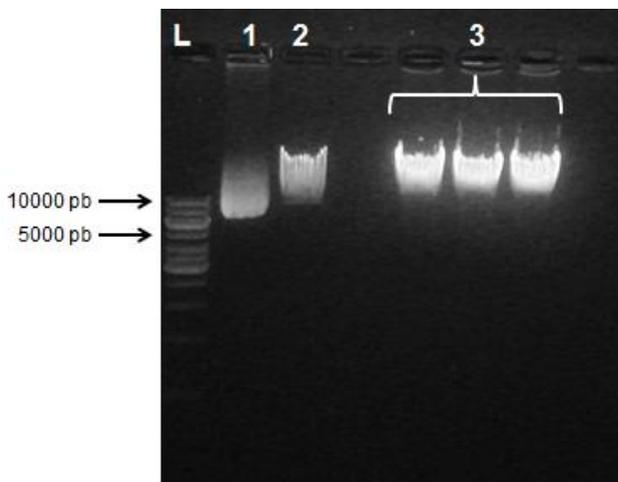


Figura 18: Digestão do vetor *pX459.V2*. Eletroforese em gel de agarose 1 % do produto de digestão do vetor *pX459.V2* com a enzima *BbsI*. L. Marcador de peso molecular *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder*. 1. Vetor *pX459.V2* não digerido. 2 e 3. Produto da digestão do vetor *pX459.V2* com a enzima *BbsI*. Banda esperada de 9,1 kb.

A verificação da clonagem foi feita por PCR de colônia, com a utilização dos oligonucleotídeos IFN β 1 guia e CAG *enhancer* (tabela 4 – anexo 2) . As condições foram estabelecidas em nosso laboratório, respeitando as indicações do fabricante da *GoTaq DNA* polimerase (*Promega*), e também com base nas temperaturas dos oligonucleotídeos. A reação ocorreu em 35 ciclos obedecendo às temperaturas de 94 °C por 30 segundos para a desnaturação, 60 °C por 30 segundos para o anelamento dos primers e 72 °C por 15 segundos para a extensão. O volume final das reações foi de 10 μ L.

O produto de amplificação foi resolvido em gel de agarose 2,5 % em tampão TBE, a 90 V por uma hora. O gel foi corado com solução contendo brometo de etídio. Na Figura 19 as amostras 1 – 4 obtiveram uma amplificação de tamanho referente aos clones positivos (444 pb), a

amostra 5 não houve amplificação e as amostras 6 – 7 obtiveram uma amplificação de tamanho diferente do esperado. Na Figura 20 as amostras obtiveram uma amplificação de tamanho esperado. Após a confirmação da clonagem através da técnica de sequenciamento, os vetores *pX330-IFN β 1* e *pX459.V2-IFN β 2* foram amplificados em bactérias *E. coli* Top10^r, como descrito na Metodologia.

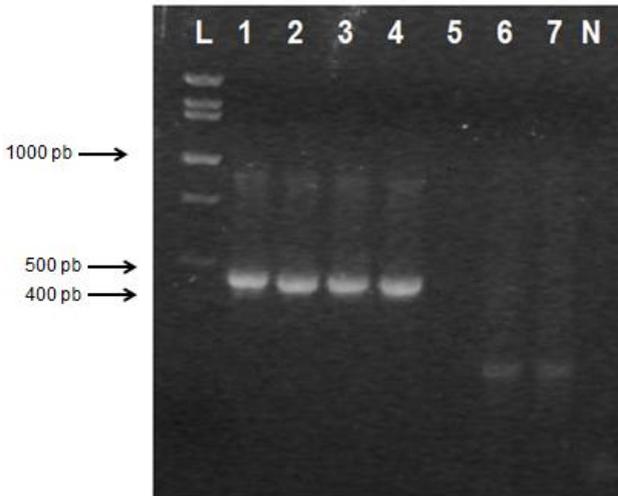


Figura 19: PCR de colônia do vetor *pX300-IFN β 1*. Corrida eletroforética em gel de agarose 1,5 % dos produtos de PCR de. Os fragmentos esperados possuem 444 pb. L. Marcador de peso molecular 100 pb *Low Scale DNA Ladder*. 1 – 7. Produto de PCR de colônia. N. Controle negativo da reação de PCR.

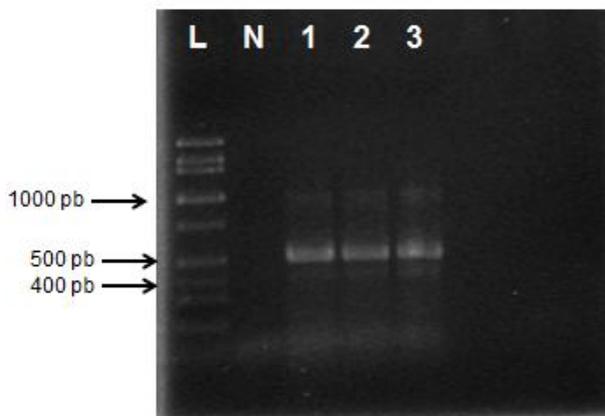


Figura 20: PCR de colônia do vetor *pX459.V2-IFN β 2*. Corrida eletroforética em gel de agarose 1,5 % dos produtos de PCR de. Os fragmentos esperados possuem 444 pb. L. Marcador de peso molecular 100 pb *Low Scale DNA Ladder*. N. Controle negativo da reação de PCR. 1 – 3. Produto de PCR de colônia.

Validação dos construtos

Para garantir que a construção IRES-DsRed e o guia IFN β 1 eram funcionais e poderiam ser utilizados para a modificação celular, realizou-se a co-transfecção dos vetores na linhagem celular HEK293. Para isso, 1×10^5 células/poço da linhagem celular HEK293 foram transfectadas com os plasmídeo *pX330-IFN β 1* (0,5 μ g) e *pDonor-DsRed* (1,5 μ g) utilizando o reagente de transfecção FuGENE (Promega) seguindo o protocolo de transfecção específico para este tipo celular (proporção 3:1 – FuGENE-DNA). As células foram mantidas em placas de 12-poços, na estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ com 0,5 mL de meio de cultura DMEM-F12c (10 % SFB; 1 % L-glutamina; 1 % pen/strep). Após 72 horas, as células foram estimuladas com 5 μ g/mL de *poly I:C* (Thermo Fisher Scientific), pelo método de transfecção com o reagente FuGENE e mantidas na estufa a 37 °C, por

24 horas. Quantificou-se parte das células quanto à expressão da proteína DsRed pela técnica de citometria de fluxo, enquanto outra parte das células foi contracorada com solução contendo DAPI e visualizada ao microscópio de fluorescência convencional (Olympus BX40) e as imagens obtidas com o acoplamento de uma câmera (Olympus DP72). As aquisições das imagens foram feitas através do software *Olympus Cell P*. Como resultado, tanto por citometria de fluxo como por microscopia de fluorescência, observa-se que cerca de 1 % das células receberam a modificação e responderam ao estímulo com a produção de DsRed (Figura 21).

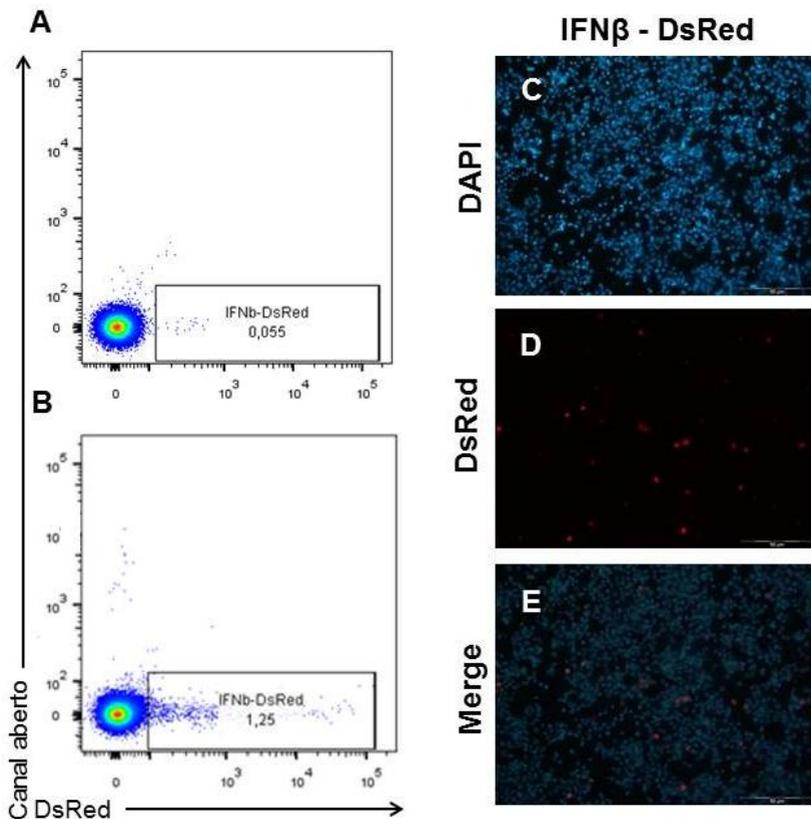


Figura 21: Validação das construções *pX330-IFNβ1* e *pDonor-DsRed*. Experimento realizado na linhagem celular HEK293. As células foram transfectadas com os vetores *pX330-IFNβ1* e *pDonor-DsRed*, estimuladas com *poly I:C* e a identificação da fluorescência foi determinado pelos métodos de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. (A). *Dotplot* de citometria de fluxo do grupo controle transfectado sem estímulo. (B). *Dotplot* de citometria de fluxo das células transfectadas estimuladas com *poly I:C*. (C). Células transfectadas e estimuladas coradas com DAPI. (D). Células transfectadas e estimuladas. (E). *Merge* das imagens C e D.

Os resultados obtidos eram esperados, visto que a literatura reporta que entre 5 – 15 % das células produzem IFN β e que a taxa de recombinação celular é de aproximadamente 10 %, que valida à

funcionalidade das construções (Apostolou e Thanos, 2008; Zhao et al., 2012; Yang et al., 2014; Patil et al., 2015).

Transfecção das linhagens celulares, diluição limitante e expansão das colônias

Com o objetivo de produzir uma linhagem estável e responsiva ao IFN β , as linhagens celulares HEK293 e HEK293-IFNAR1-KO foram transfectadas com os plasmídeos *pX330-IFN β 1* (0,5 μ g) e *pDonor-DsRed* (1,5 μ g) utilizando o reagente de transfecção FuGENE (Promega). As células foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) e submetidas ao protocolo de transfecção e mantidas em placas de 12-poços, em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida contendo 5 % de CO $_2$ com 0,5 mL de meio de cultura DMEM-F12c (10 % SFB; 1 % L-glutamina; 1 % pen/strep). 72 horas pós-transfecção, as células foram tripsinizadas e diluídas em meio DMEM-F12c (10 % SFB; 1 % L-glutamina; 1 % pen/strep) e distribuídas em placas de 96-poços no número de 0,5 células/poço (volume final de 200 μ L/poço), sendo mantidas em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida contendo 5 % de CO $_2$ por 10 – 14 dias para sua expansão e análise. Como controle de eficiência da técnica um grupo de células foi transfectado utilizando o vetor *pDsRed2-N* (Addgene plasmid #54493), vetor comercial que expressa a proteína DsRed. Essas células foram adquiridas no equipamento de citometria de fluxo para determinar a porcentagem de células positivas para o fluorocromo DsRed, apresentados na Figura 22, onde é possível observar uma eficiência de transfecção de 89,3 % de células positivas.

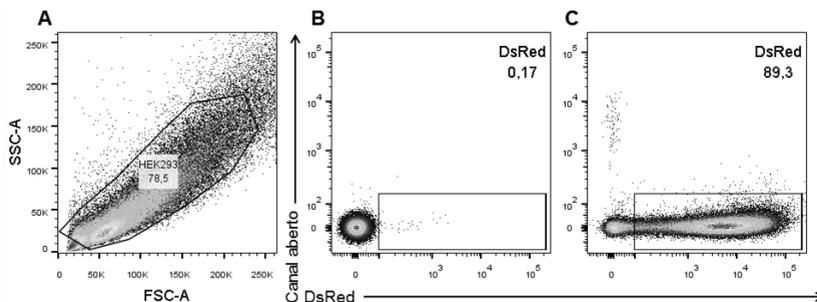


Figura 22: Controle de transfecção. Determinação da porcentagem de células transfectadas utilizando o vetor controle *pDsRed2-N1* (Addgene #54493). (A). Gráfico de citometria de fluxo indicando a estratégia de *gating* utilizada na análise. (B). Grupo controle sem transfecção. (C). Grupo de células transfectadas com o vetor *pDsRed2-N1*.

Análise fenotípica das colônias

Após o crescimento dos clones, uma parte das células foi transferida para uma placa de 96-poços e, quando atingiam a confluência de 70 %, foram estimuladas com 100 μ L de DMEM suplementado com 5 μ g/mL de *poly I:C* (Thermo Fisher Scientific). Decorrida 24 horas, os clones foram visualizados em microscópio de fluorescência convencional (Olympus BX40). Foram analisados um total de 743 clones, os quais não apresentaram a modificação desejada, visto que os clones não produziram DsRed após o estímulo com *poly I:C*. Como a porcentagem de células IFN β -DsRed corresponde a aproximadamente 1 % da cultura (Figura 21), optamos por separar as células por *Cell Sorting* com o objetivo de facilitar o isolamento dos clones IFN β -DsRed positivos. Esse experimento foi realizado no Instituto Carlos Chagas-PR em colaboração com os Drs. Juliano Bordignon e Guilherme Silveira.

Separação por *Cell sorting*

Para a separação das células responsivas por *Cell sorting*, 3×10^5 cells./poço foram plaqueadas em placa de 6-poços e após 24 horas transfectadas com os plasmídeo *pX330-IFN β 1* (1 μ g) e *pDonor-DsRed* (1 μ g). Após 48 horas, as células foram transfectadas com 5 μ g/mL de *poly I:C* (Thermo). Passadas 24 horas, as células foram separadas por *Cell sorting* no equipamento FACS Aria (BD Biosciences). Ao final do procedimento foi possível recuperar uma pequena quantidade de células, contudo as mesmas não sobreviveram à metodologia de separação (Figura 23). A literatura reporta que grandes quantidades de IFN são deletérios para as células, o que poderia justificar tal acontecimento (Zhao et al., 2012; Patil et al., 2015).

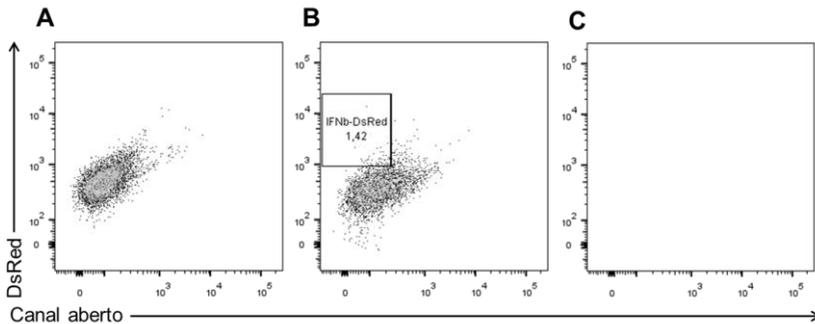


Figura 23: Separação das células por *Cell sorting*. Separação de células responsivas pelo método de *Cell Sorting*. Gráfico de citometria de fluxo indicando a estratégia de *gating* utilizada na análise. (A). Grupo controle sem transfecção. (B). Grupo de células transfectadas e estimuladas pré-*sorting*. (C). Grupo de células transfectadas e estimuladas pós-*sorting*.

Dessa forma como alternativa para avaliar a inserção da sequencia IRES-DsRed seguido ao gene *ifnb*, optou-se por selecionar as colônias pela técnica de PCR.

Análise genotípica das colônias

Após a extração do gDNA, seguindo o protocolo descrito anteriormente, a verificação da inserção da sequência IRES-DsRed seguido ao gene *ifnb* foi realizada por PCR, utilizando iniciadores para regiões anteriores e posteriores a região de inserção, com a utilização dos oligonucleotídeos IFN β sense e IFN β antisense. As condições obedecem às concentrações indicadas pelo fabricante da *GoTaq DNA* polimerase (*Promega*). A reação ocorreu em 35 ciclos obedecendo às temperaturas de 94 °C por 30 segundo para a desnaturação das fitas de DNA, 52 °C por 30 segundos para o anelamento dos primers e 72 °C por três minutos para a extensão das fitas. As reações foram realizadas com volume final de 25 μ L.

O produto de amplificação foi resolvido em gel de agarose 1 % em tampão TBE, a 90 V por uma hora. O gel foi corado com solução contendo brometo de etídio. Os produtos de amplificação esperados possuem 2,5 kb (colônias positivas) e 330 pb (colônias negativas). Foram analisados um total de 660 clones, os quais não apresentaram a inserção da sequencia DsRed, seguida do gene *ifnb*. A Figura 24 corresponde a um resultado representativo das reações resolvidas em gel, onde é possível a identificação de uma banda referente à amplificação da porção terminal do gene *ifnb* de 330 pb. Os clones positivos devem apresentar uma banda de amplificação de 2,4 kb.

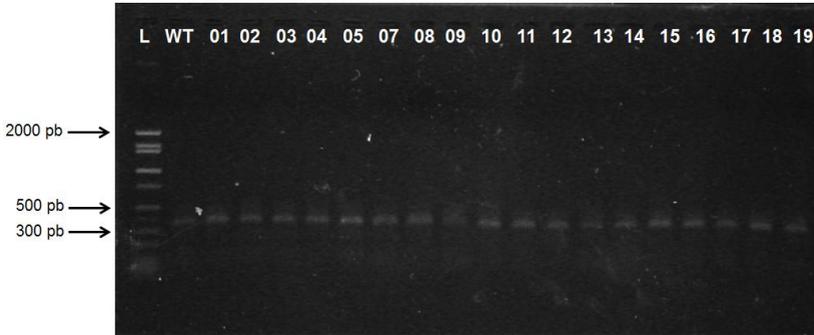


Figura 24: Genótipo dos clones IFN β -DsRed. Corrida eletroforética em gel de agarose 1 % dos produtos de PCR. Os fragmentos esperados possuem 330 pb (clones sem modificação) e 2,4 kb (clones com inserção). L. Marcador de peso molecular 100 pb *Low Scale DNA Ladder*. H. Produto de PCR da célula parietal HEK293. 1 – 19. Produto de PCR dos clones de 1 – 12.

A partir deste ponto, em conversa com um colaborador, foi questionado se o guia utilizado neste trabalho, que promove a abertura do genoma para a recombinação da sequência IRES-DsRed, não estaria identificando também a sequência doadora, visto que o plasmídeo *pDonor-DsRed* possui uma região homóloga ao genoma. Dessa forma ao analisar as sequências, guia IFN β 1 e *pDonor-DsRed*, foi identificado homologia entre elas, o que justificaria o não isolamento de um clone mutante até o presente momento, pois mesmo que a recombinação esteja sendo feita em tempo hábil antes da abertura e degradação do vetor *pDonor-DsRed*, o genoma das células modificadas seriam alvo da Cas9, diminuindo a eficiência em isolar os clones IFN β -DsRed. Sendo assim, como alternativa o trabalho foi dividido em duas frentes: a clonagem de um novo guia denominado IFN β 2 (Figuras 18 e 20) capaz de reconhecer somente o genoma da célula-alvo e a mutação dirigida do vetor *pDonor-DsRed* no sítio de reconhecimento da Cas9 referente a troca de uma guanina por uma adenina (Figura 25).

Mutagênese

Para realizarmos a mutação do vetor *pDonor-DsRed*, foi utilizado o kit *GeneArt® Site-Directed Mutagenesis PLUS* (Thermo Fisher Scientific). Para isso, foram desenhados oligonucleotídeos Mut.DsRed.donor sense e Mut.DsRed.donor antisense (Tabela 4 – Anexo 1), para o sítio de mutação de sequências seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A confirmação foi realizada pela técnica de sequenciamento pelo método de Sanger (Figura 25).

```

pDonor-DsRed → CCTCTCTTTATCAACAAACTTGCAAGAAAGATTAAGGAGGAAAGAAATAAGGATCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAA
Mut 01 → CCTCTCTTTATCAACAAACTTGCAAGAAAGATTAAGGAGGAAAGAAATAAGGATCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAA
Mut 02 → CCTCTCTTTATCAACAAACTTGCAAGAAAGATTAAGGAGGAAAGAAATAAGGATCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAA
Mut 03 → CCTCTCTTTATCAACAAACTTGCAAGAAAGATTAAGGAGGAAAGAAATAAGGATCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAA
Mut 04 → CCTCTCTTTATCAACAAACTTGCAAGAAAGATTAAGGAGGAAAGAAATAAGGATCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAA
Primer → AAGATTAAGGAGGAAAGAAATAAGGATCCGCC
  
```

Figura 25: Mutagênese do vetor *pDonor-DsRed*. Análise do sequenciamento do produto de mutagênese nos clones 01, 02, 03 e 04. *Primer*: sequência do iniciador sense utilizado para a mutagênese. *pDonor-DsRed*: sequência do vetor utilizado para a mutagênese.

Após a confirmação da mutação, novos experimentos de transfecção com o mutante 01 foram realizados, juntamente com o vetor *pX459.V2-IFN β 1*. Contudo, não foram obtidos clones positivos para a inserção IRES-DsRed.

Smart Flare

Como alternativa para a detecção da produção de IFN β em linhagens de cultura celular, optamos pela utilização de sondas fluorescentes *Smart Flare (IFN β -Human, Cyanine 5 RNA Detection Probe, Merck – MILLIPORE, Darmstadt, HE, Alemanha)*. De acordo

com o fabricante, é possível a detecção do RNAm de interesse pelas técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência em células vivas, sem a necessidade de fixação celular. Para isso, células da linhagem A549 foram cultivadas em placas de 24-poços na confluência de 70-80 %, onde foi adicionada a sonda *Smart Flare* na concentração de 100 μ M. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ por 16 horas. Em seguida, as células foram infectadas com vírus VSVeGFP MOI 0,0001 e VSV inativado com UV por 45 minutos (iVSV) na MOI 10. Após o período de 12 horas, o sobrenadante da cultura foi retirado e as células foram destacadas da placa de cultura, com a utilização de tripsina 0,05 % (Thermo Fisher Scientific), transferidas para um tubo plástico de 1,5 mL e centrifugadas a 460 x g por cinco minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e as células ressuspendidas em aproximadamente 200 μ L de tampão FACS. As células foram adquiridas por citometria de fluxo no equipamento FACS Verse (BD Biosciences) e os gráficos representativos estão apresentados na Figura 26.

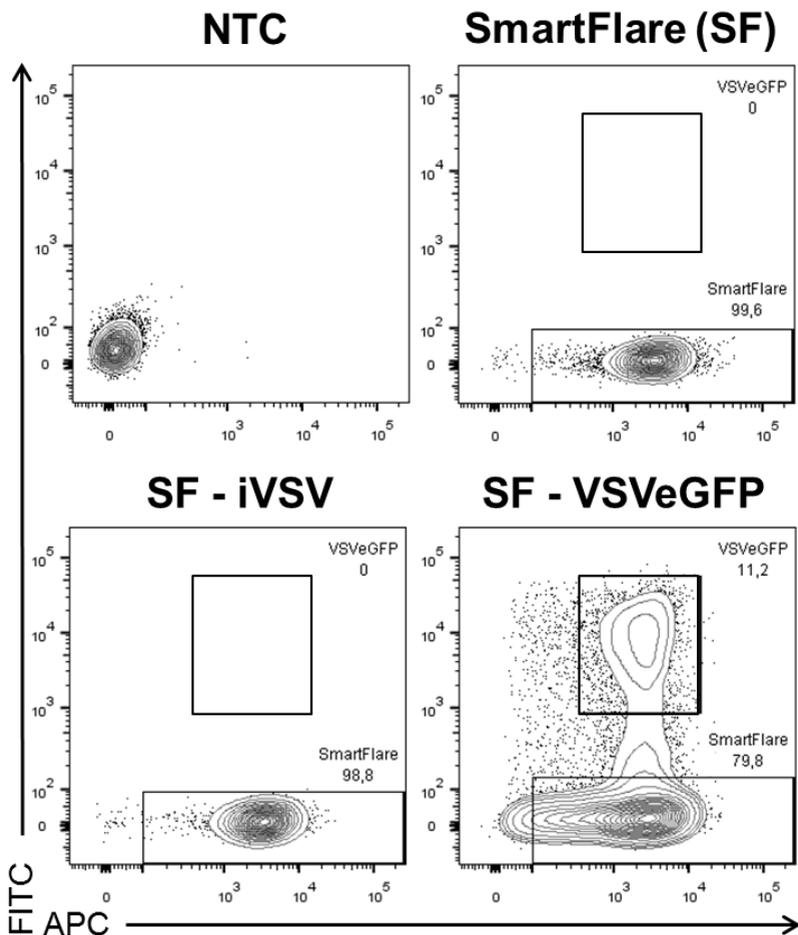


Figura 26: Sonda *Smart Flare IFN β -Human, Cyanine 5*. Células A549 com a sonda para a detecção de RNAm de IFN β . Gráficos de citometria de fluxo dos grupos de células A549 (NTC) sem a adição da sonda, (SF) com a adição da sonda, (SF - iVSV) estimuladas com iVSV e (SF - VSVeGFP) infectadas com VSV.

Os resultados de citometria de fluxo indicaram um deslocamento da intensidade de fluorescência entre os grupos que receberam a sonda *Smart Flare* (SmartFlare, SF-iVSV e SF-VSVeGFP), em comparação ao grupo controle que não recebeu (NTC). Contudo,

não se verificou diferenças significativas entre os grupos não estimulado (SmartFlare) com os grupos estimulados (SF-iVSV e SF-VSVeGFP). Dessa forma, foi realizado um novo experimento com diferentes concentrações de sonda, como indicação do fabricante, desta vez foi utilizado o vírus DENV2 MOI 1 por 24 horas. As etapas de infecção, obtenção das células e aquisição por citometria de fluxo obedeceram aos procedimentos descritos anteriormente. Os gráficos de intensidade de fluorescência estão representados na Figura 27. É possível observar que não houve diferença significativa na intensidade de fluorescência entre os grupos não infectados, representados em azul, em comparação ao grupo infectado, representado em vermelho. A partir desses dados, concluímos que talvez pela técnica de citometria de fluxo não fosse possível fazer a detecção de células positivas para o RNAm de IFN β , visto que a literatura reporta que uma pequena porcentagem de células pode ser responsável pela a produção do mesmo durante a infecção, e que provavelmente essa porcentagem não seria capaz de deslocar a intensidade de fluorescência ao ponto de ser detectado pela técnica utilizada (Apostolou e Thanos, 2008; Zhao et al., 2012; Yang et al., 2014; Patil et al., 2015, Voigt et al., 2015).

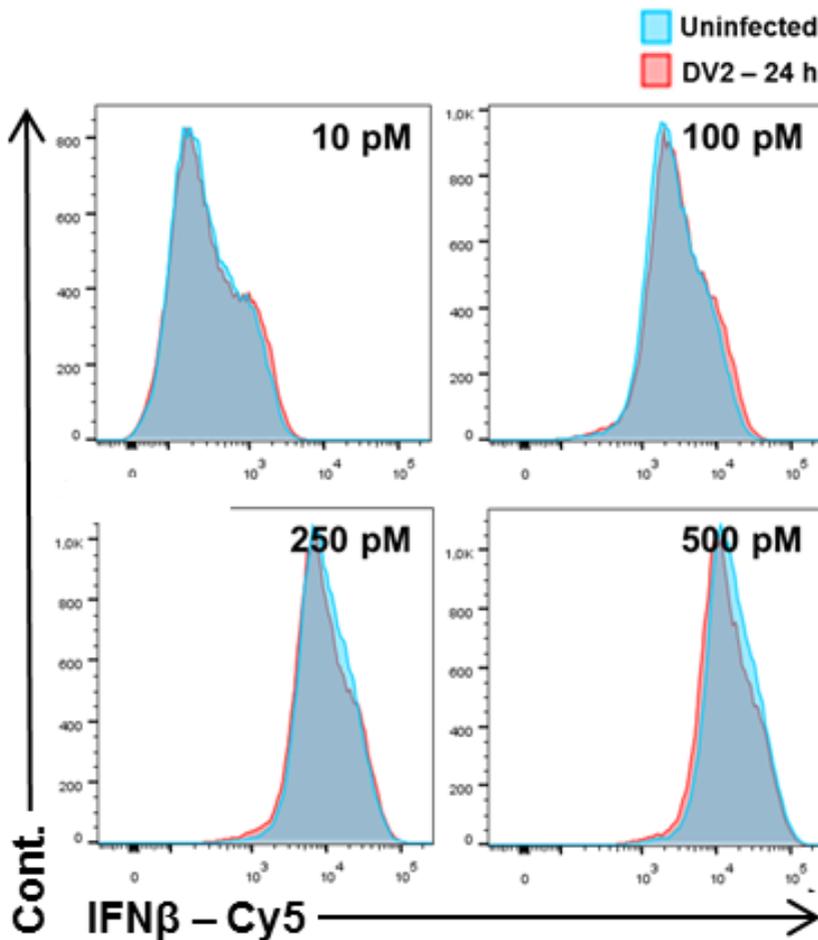


Figura 27: Padronização da sonda *Smart Flare IFN β -Human, Cyanine 5*. Gráficos de intensidade de fluorescência obtidos pela técnica de citometria de fluxo com diferentes concentrações de sonda para a detecção do RNAm de IFN β após 24 horas de infecção com DENV2 MOI 1 (linha vermelha) comparadas com as células marcadas e sem infecção (linha azul).

Isso posto, optamos pela técnica de microscopia de fluorescência para a observação das células produtoras de IFN β com o auxílio da sonda fluorescente. Desse modo, células A549 foram cultivadas em placa de 24-poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm.

Quando as células atingiram a confluência de 70-80 % foi adicionado aos poços a sonda *Smart Flare* na concentração de 100 μ M. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ por 16 horas. Em seguida as células foram infectadas com iVSV MOI 10. Logo após seis horas as células foram fixadas e contra coradas com DAPI, como descrito anteriormente na metodologia. As fotos foram adquiridas no microscópio confocal A1R Si (Nikon, Minato, Japão) do Laboratório Imunobiofotônica da Universidade Federal de Minas Gerais (Figura 28).

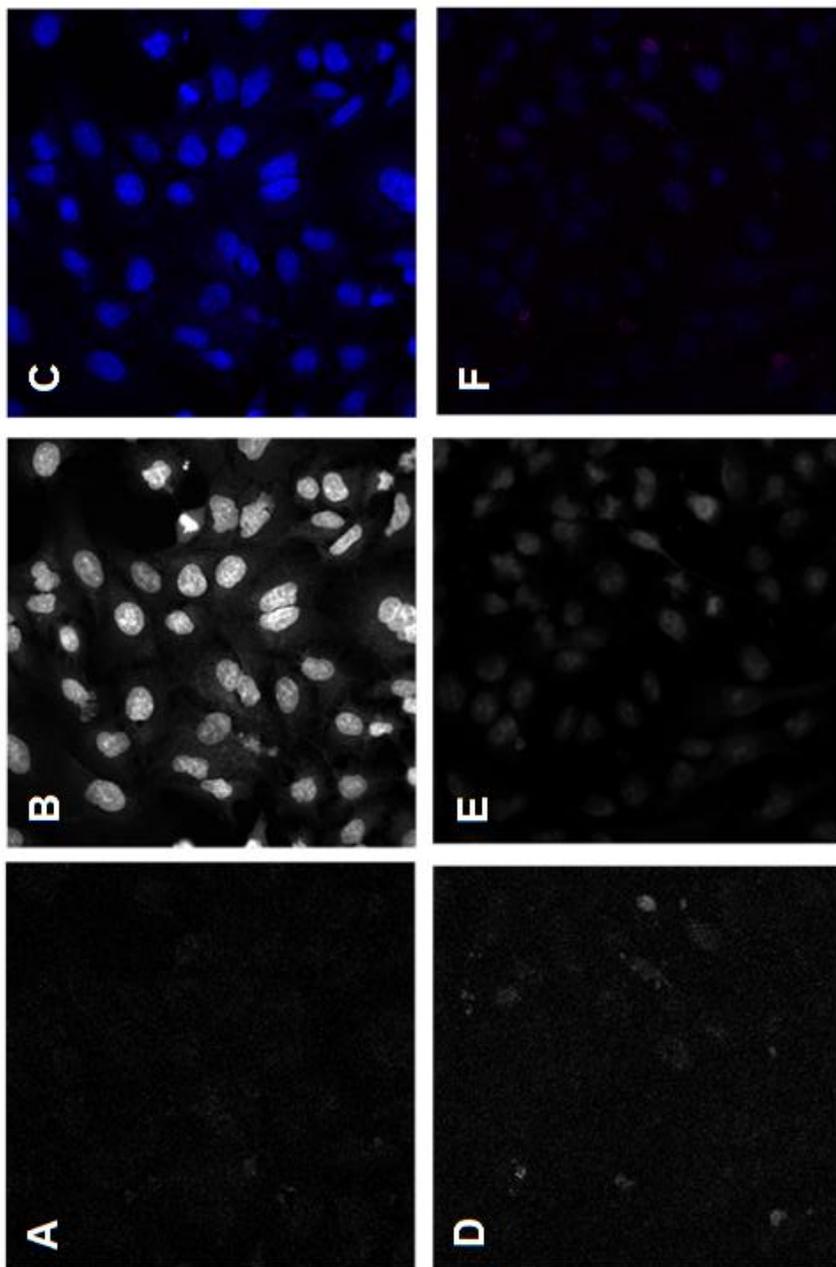


Figura 28: Microscopia confocal com a sonda *Smart Flare IFN β -Human, Cyanine 5*. Imagens de microscopia confocal de células da linhagem A549 que receberam a sonda fluorescente para a detecção de RNAm de IFN β e contra coradas com DAPI. (A) Células sem estímulo visualizadas no filtro para a fluorescência Cy5. (B) Células sem estímulo visualizadas no filtro azul. (C). Merge das imagens A e B. (D) Células estimuladas por seis horas com iVSV MOI 10 visualizadas no filtro para a fluorescência Cy5. (E) Células estimuladas por seis horas com iVSV MOI 10 visualizadas no filtro azul. (F) Merge das imagens D e F.

Até o presente momento não foi possível identificar células positivas para a fluorescência da sonda *IFN β -Human, Cyanine 5*.

ANEXO – Lista de reagentes

Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos. Sequências de iniciadores utilizados no trabalho.

Nome	Sequência
CAG enhancer	TGA CTA ATA CGT AGA TGT ACT GCC AA
IFNAR1 sense	CGA ACA TGT AAC TGG TGG GA
IFNAR1 antisense	CCA CTT TCT CCT GGT TGA TTT G
IFNb sense	GGA TTC TGC ATT ACC TGA AGG C
IFNb antisense	ACT GCC ATG TTG ACT TTT GC
IFNb guia 1 sense	CAC CGG AGA AAG ATT AAG GAG GAA GG
IFNb guia 1 antisense	CCT TCC TCC TTA ATC TTT CTC CGG TG
IFNb guia 2 sense	CACCGCAGACTTACAGGTTACCTCCGAAAC TGAAGA
IFNb guia 2 antisense	TCTTCAGTTTCGGAGGTAACCTGTAAGTCTGCGGT G
Mut.DsRed.dono r sense	AAGATTAAGGAGGAAAGAATAAGGATCCGCC
Mut.DsRed.dono r sense	GGCGGATCCTTA TTCTTTCCTCCTTAATCTT
qPCR h/m 18S sense	TAG AGG GAC AAG TGG CGT TC
qPCR h/m 18S antisense	CGC TGA GCC AGT CAG TGT
qPCR h IFNb sense	TGC TCT CCT GTT GTG CTT CTC C

qPCR h IFN β antisense	CAT CTC ATA GAT GGT CAA TGC GG
qPCR h IKBA sense	TAC ACC TTG CCT GTG AGC AG
qPCR h IKBA antisense	TAG CCT TCA GGA TCA GGA TGG AGT GG
qPCR h ISG15 sense	TCC TGG TGA GGA ATA ACA AGG G
qPCR h ISG15 antisense	CTC AGC CAG AAC AGG TCG TC
qPCR HSV ICP27 sense	GTGCAAGATGTGCATCCACCACAACCTGCC
qPCR HSV ICP27 antisense	GCCAGAATGACAAACACGAAGGATGCAATG
qPCR m CXCL10 sense	ACT GCA TCC ATA TCG ATG AC
qPCR m CXCL10 antisense	TTC ATC GTG GCA ATG ATC TC
qPCR m IFN α sense	TCT GAT GCA GCA GGT GGG
qPCR m IFN α antisense	TCA CCT CCC AGG CAC TGA
qPCR m IFN β sense	AGCTCCAAGAAAGGACGAACAT
qPCR m IFN β antisense	AGA TCA ACC TCA CCT ACA GGG C
qPCR m IKBA sense	CTG CAG GCC ACC AAC TAC AA

qPCR m IKBA antisense	CAG CAC CCA AAG TCA CCA AGT
qPCR m RIG-1 sense	TCCCAGCAATGAGAATCCT
qPCR m RIG-1 antisense	GTCAATGCCTTCATCAGC
qPCR YFP sense	TTC ATC GTG GCA ATG ATC TC
qPCR YFP antisense	GCG GTC ACG AAC TCC AGC AGG

Tabela 3: Anticorpos utilizados nos experimento de imunofluorescência, *Phosflow* e *Western blotting*.

Anticorpos	Finalidade
4G2 mouse anti proteína E de flavivírus (ICC; diluição 1: 400)	Citometria de fluxo e Imunofluorescencia
Alexa Fluor 488 rabbit anti mouse IgG (Molecular Probes – A11059; diluição 1: 500)	Citometria de fluxo e Imunofluorescencia
Alexa Fluor 568 rabbit anti mouse IgG (H+L) (Invitrogen – A11061; diluição 1: 500)	Imunofluorescencia
Alexa Fluor 633 rabbit anti mouse IgG (H+L) (Invitrogen – A21063; diluição 1:500)	Imunofluorescencia
Alexa Fluor 647 mouse anti-TBK1 (pS172) (BD – 558603; diluição 1:10)	<i>Phosflow</i>
Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Molecular Probes – A21245; diluição 1:500)	Imunofluorescencia
Anti-mouse IgG, HRP (Cell Signaling – 7076S; diluição 1:500)	<i>Western blotting</i>
Anti-rabbit IgG, HRP (Cell Signaling – 7074S; diluição 1:500)	<i>Western blotting</i>
β -actina monoclonal mouse, anti-human (AbCam – ab6276; diluição 1:500)	<i>Western blotting</i>
Goat anti-Human IgG (Thermo Fisher Scientific – 628400; diluição 1:500)	<i>Western blotting</i>
ISG15 monoclonal mouse, anti-human (R&D – MAB4845; diluição 1:500)	<i>Western blotting</i>
NF- κ B p65, monoclonal rabbit (Cell Signaling – 3033s; diluição 1:10)	Imunofluorescência
Pacific Blue mouse anti Stat1 (pY701)	<i>Phosflow</i>

(BD – 560310; diluição 1:10)	
PE-Cy 7 mouse anti-p38 MAPK (pT180/pY182) (BD – 560241; diluição 1:10)	<i>Phosflow</i>
pSTAT1 monoclonal mouse, anti-human (AbCam – ab3987; diluição 1:500)	Imunofluorescência e <i>Western blotting</i>
pSTAT1 monoclonal rabbit (Cell Signaling – 9177p; diluição 1:10)	<i>Phosflow</i>
STAT1 monoclonal mouse, anti-human (AbCam – ab29045; diluição 1:500)	Imunofluorescência e <i>Western blotting</i>
