

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

JÚLIA AMANDA CERATO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FERRAMENTAS PARA
ESTUDOS DO PAPEL DA OSTEOPONTINA DURANTE A INFECÇÃO PELO
VÍRUS DA DENGUE**

CURITIBA

2021

i



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

JÚLIA AMANDA CERATO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FERRAMENTAS PARA
ESTUDOS DO PAPEL DA OSTEOPONTINA DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS
DA DENGUE**

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Ana Luiza Pamplona Mosimann
Co-orientadora: Priscilla Fanini Wowk

CURITIBA

2021

ii

Cerato, Júlia Amanda.

Desenvolvimento e caracterização de ferramentas para estudos do papel da osteopontina durante a infecção pelo vírus da dengue / Júlia Amanda Cerato. - Curitiba, 2021.

xvii, 93 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2021.

Orientadora: Ana Luiza Pamplona Mosimann.

Co-orientadora: Priscilla Fanini Wowk.

Bibliografia: f. 70-78

1. dengue . 2. ferramentas. 3. modulação. 4. osteopontina. 5. vírus. I.
Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.

Aos 16 dia do mês de dezembro de dois mil e vinte e um, às 09:00 horas, através de teleconferência pelo link <https://us06web.zoom.us/j/4096776887>, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Alejandro Correa Dominguez, Dra. Dalila Luciola Zanette e Dra. Adriana Lima Vallochi, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata Júlia Amanda Cerato intitulada: "Desenvolvimento e caracterização de ferramentas para estudos do papel da osteopontina durante a infecção pelo vírus da dengue", sob a orientação de Dra. Ana Luiza Pamplona Mosimann e Dra. Priscilla Fanini Wowk, para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pela Presidente Dr. Alejandro Correa Dominguez. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

- Aprovação da dissertação por unanimidade
 Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).
 Reprovação da dissertação

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Dr. Alejandro Correa Dominguez – ICC/FIOCRUZ

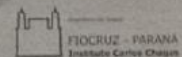
Dra. Dalila Luciola Zanette – ICC/FIOCRUZ

Dra. Adriana Lima Vallochi – IOC/FIOCRUZ

Candidato(a): Júlia Amanda Cerato

+55(41)3316-3230

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 - CIC 81350-010 Curitiba/PR, Brasil



A Elis e Marcos, que sempre estiveram ao meu lado com palavras de apoio e bons momentos, a vocês, meus pais, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Dr.^a Ana Luiza Pamplona Mosimann por aceitar me guiar e ser minha mentora durante todo o período de mestrado, mesmo em outro país sempre se fez presente. Sua perseverança frente aos desafios, sua dedicação e sua esperteza são algumas de suas qualidades que mais admiro e agradeço por compartilhá-las comigo. A Dr.^a Priscilla Fanini Wowk que sempre torna as situações mais leves e nos inspira a seguir a carreira científica frente a tantas dificuldades, obrigada por concordar a desvendar os mistérios do projeto comigo e por todos os conselhos.

Aos colegas Allan Henrique Depieri Cataneo, Antonio Ernesto Meister Luz Marques, Claudia Teresinha Shuertz Del Sechi, Gabriela Mattoso, Gisiane Emanuele Gruber, Guilherme Soares, Humberto Gravina, Nathalia Cavalheiro Auwerter, Stefanny Lucía Viloche Morales e Thiago Estefano Rodrigues, pelos conselhos, risadas, conversas e apoio e principalmente por fazer os dias mais divertidos e os tempos de espera mais rápidos. Em especial a Juliana Bernardi Aggio, Karoline Fontana Agostinho, Nina de Moura Alencar e Thais Santana de Lima, obrigada por sempre me acalmar, por toda a ajuda e alegrar meus dias. Aos doutores Andréia Akemi Suzukawa, Adara Áurea dos Santos, Daisy Maria Strottmann e Juliano Bordignon por todo apoio científico, principalmente a Andrea Cristine Koishi, sem ela nenhum reagente seria encontrado. A equipe dos laboratórios de apoio de pesagem, preparação e água e preparo e lavagem de materiais. A toda equipe da Plataforma de Microscopia Confocal e Eletrônica do Instituto Carlos Chagas, especialmente a Bruna Hilzendeger Marcon por passar seus conhecimentos e me ensinar a capturar imagens magníficas. E ao Rodrigo Netto Costa por sua disponibilidade em passar minhas amostras no FACS Canto II.

Agradeço a CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todos meus amigos e familiares que me apoiaram, não há palavras para descrever a rede suporte que tenho. Agradeço aos meus pais, Elis Regina Cerato e Marcos Aurélio Cerato, meu irmão Marcos Vinícius Cerato e minhas sobrinhas Manuela e Luiza, vocês são minha base. A Keli Regina Cerato, Eduarda Cerato Dallagrana, Gabriela Cerato Yamashita e Letícia Pacheco por me lembrar que a vida não é só estudo. A Amanda Barutti e Taysa Marcon, apesar de distantes, sempre me incentivam e torcem por mim. Também agradeço a Larissa Araujo Lalli, Mônica Moura Milek e Vitória Luiza Cavalheiro, obrigada por me entender e aguentar meus surtos leves.

“Everyday can be a better day despite the challenge
All you gotta do is leave it better than you found it
It's gonna get difficult to stand but hold your balance”

- Surfaces/ Frank Forrest Neil/ Padalecki Colin Vincent

RESUMO

A dengue é a arbovirose que se alastra mais rapidamente pelo mundo constituindo um sério problema de saúde pública global. É uma doença com um amplo espectro de manifestações clínicas, responsável por aproximadamente 100-400 milhões de infecções por ano no mundo. O Brasil contribui com o maior número de casos notificados de dengue. Não há tratamento específico para dengue, sendo assim necessária a busca de potenciais alvos para terapias antivirais como proteínas celulares que possuem a expressão passível de modulação e que são relevantes durante a infecção com o *Dengue virus* (DENV). A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína, envolvida em diversos sinais transcripcionais e vias de sinalização. Também foi sugerido seu envolvimento na polarização da resposta imune celular. Em processos inflamatórios, tais como infecções virais, a expressão da OPN se encontra aumentada. Para avaliar o papel da OPN e a dinâmica da sua expressão durante a infecção *in vitro* com o DENV o presente projeto focou no desenvolvimento e caracterização de ferramentas para estudo desta proteína. Quatro anticorpos monoclonais (AcMs) anti-OPN foram caracterizados quanto ao seu perfil de reatividade em linhagens celulares através da técnica de imunofluorescência indireta e pela técnica de *Western Blot* quanto a sua reatividade à proteína recombinante. Os AcMs apresentam perfis de reação distintos nas linhagens testadas e apenas um dos AcMs apresentou reatividade no *Western Blot*. Para gerar uma linhagem de células A549 deficientes em OPN duas estratégias distintas foram empregadas, a partir do uso do sistema constituído por repetições palindrômicas curtas interespaçadas e regularmente agrupadas (CRISPR) e sua proteína associada 9 (Cas9). A primeira estratégia foi baseada na eletroporação do complexo ribonucleoprotéico e a segunda baseada na eletroporação do plasmídeo a partir do qual é transcrito o RNA guia e o RNA mensageiro para síntese de SpCas9 na célula alvo. Embora as duas estratégias tenham mostrado indícios de edição gênica, o desenvolvimento de uma linhagem clonal deficiente na expressão de osteopontina ainda não foi possível. Resultados preliminares do grupo e a literatura indicavam que a OPN é modulada durante a infecção com DENV. Desse modo, células A549 foram infectadas com DENV-4 e a expressão de OPN foi avaliada em diferentes tempos pós-infecção. No entanto, não foi observada alteração na expressão da OPN nas células A549 infectadas ou não com DENV. Por fim, o trabalho que foi realizado contribuiu na assimilação de conhecimento técnico sobre as técnicas de edição gênica empregadas, contribuiu para uma melhor caracterização dos AcMs previamente gerados no laboratório e nos permitiu avançar na compreensão do papel que a proteína desempenha durante a infecção por DENV.

Palavras-chaves: dengue; ferramentas; modulação; osteopontina; vírus.

ABSTRACT

Dengue is an arbovirus that rapidly spreads across the world constituting a serious global public health issue. It is a disease with a large spectrum of clinical manifestations, responsible for approximately 100-400 million infections per year in the world. Brazil contributes with the highest number of dengue notified cases. There isn't a specific treatment for dengue, so it is necessary to seek for potential targets of antiviral therapies such as cellular proteins that are susceptible to expression modulation and are relevant during infection with *Dengue virus* (DENV). Osteopontin (OPN) is a glycoprotein, involved in several transcriptional signs and signaling pathways. It has also been suggested to be involved in the polarization of the cellular immune response. In inflammation processes, as viral infections, OPN is upregulated. To assess the role of OPN and its expression dynamics during the *in vitro* infection with DENV, this project has focused on the development and characterization of tools to study the protein in question. Four anti-OPN monoclonal antibodies (mAbs) were characterized regarding their reactivity profile in cell lines through the indirect immunofluorescence technique and through *Western Blot* regarding their reactivity to the recombinant protein. The mAbs demonstrated different reaction profiles in the cell lines tested and only one mAb showed reactivity in *Western Blot*. To generate an OPN-deficient A549 cell line two different strategies were employed, making use of the system constituted of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and its associated protein 9 (Cas9). The first strategy was based on the electroporation of the ribonucleoprotein complex and the second on the electroporation of a plasmid from which a guide RNA and messenger RNA are transcribed for the synthesis of SpCas9 in the target cell. Although, both strategies have shown evidence of gene edition, the development of a clonal cell line deficient for osteopontin expression was still not possible. Preliminary results from the group and from the literature indicated that OPN is modulated during DENV infection. Thus, A549 cells were infected with DENV-4 and OPN expression was evaluated in different times post-infection. However, no change in OPN expression was observed in A549 cells with or without DENV infection. Finally, the work that was carried has contributed in the assimilation of technical knowledge about the gene editing techniques that were employed, contributed to a better characterization of the mAbs previously generated in the laboratory and allowed us to advance in the comprehension of the role the protein plays during DENV infection.

Keywords: dengue; tools; modulation; osteopontin; virus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Estrutura genômica e proteica do DENV.....	2
Figura 1.2 – Ciclo de transmissão urbano da dengue	4
Figura 1.3 – Osteopontina e seus domínios.....	6
Figura 1.4 – Receptores da OPN e suas vias de sinalização.....	8
Figura 1.5 – Disposição de éxons e <i>splicing</i> das proteoformas de OPN.....	9
Figura 1.6 – Produção de hibridomas.	12
Figura 3.1 – Localização das sequências alvo no gene <i>SPP1</i>	23
Figura 3.2 – Estratégia de amplificação do molde para transcrição <i>in vitro</i> do sgRNA	24
Figura 3.3 – Esquema dos PCRs para amplificação do DNA doador usado para reparo direcionado por homologia (HDR)	25
Figura 3.4 – Representação esquemática da PCR <i>semi-nested</i>	30
Figura 3.5 – Localização dos oligonucleotídeos iniciadores no gene.....	37
Figura 4.1 – Titulação dos anticorpos por IFI	39
Figura 4.2 – Titulação dos anticorpos por citometria de fluxo	40
Figura 4.3 – Titulação de anticorpos por <i>Western Blot</i>	41
Figura 4.4 – Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-osteopontina nas linhagens A549, HeLa MZ e Huh-7.5.....	42
Figura 4.5 – Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-osteopontina em células tronco não induzidas e células tronco induzidas à diferenciação osteogênica.....	43
Figura 4.6 – Perfil de reação dos AcMs frente à OPN recombinante por <i>Western Blot</i>	44
Figura 4.7 – Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-OPN na linhagem C6/36 por IFI.....	45
Figura 4.8 – Reatividade dos anticorpos anti-OPN na linhagem C6/36 por citometria de fluxo.....	46
Figura 4.9 – Epítomos preditos <i>in silico</i> para OPN.....	48
Figura 4.10 – Obtenção do sgRNA e DNA doador.....	49
Figura 4.11 – Esquema dos passos para obtenção de culturas deficientes na expressão de OPN	51
Figura 4.12 – Perfil de reação dos AcMs 1139D810G e 779B311E na cultura celular transfectada com RNPs que possuem como alvo o éxon 7	52
Figura 4.13 – PCR para avaliação das células deficientes em OPN.....	53
Figura 4.14 – Guias selecionados para segunda estratégia	54

Figura 4.15 – Resultado do sequenciamento	54
Figura 4.16 – Resultado do sequenciamento das células transfectados com os plasmídeos contendo as sequências do guia 2 e do guia 3	55
Figura 4.17 – Expressão relativa de mRNA de OPN nas células transfectadas	56
Figura 4.18 – Avaliação do efeito citotóxico dos compostos.	57
Figura 4.19 – Média de Intensidade de Fluorescência por poço de OPN em células tratadas com SAG e GDC-0449	58
Figura 4.20 – Titulação do estoque viral.	59
Figura 4.21 – Cinética de infecção em células A549.....	59
Figura 4.22 – <i>Primer-dimer</i> entre os oligonucleotídeos iniciadores de GAPDH	60
Figura 4.23 – Níveis de mRNA de OPN em células A549 infectadas com DENV-4..	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese do molde dos sgRNAs.....	24
Tabela 3.2 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para síntese de DNA doador.	26
Tabela 3.3 – Quantidade dos componentes utilizados em cada transfecção.....	29
Tabela 3.4 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para PCR <i>semi-nested</i> ..	30
Tabela 3.5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na quantificação dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR.....	37
Tabela 4.1 – Resultado isotipagem. Leitura de absorbância em 405 nm.	38
Tabela 4.2 – Epítomos preditos por 4 ou mais modelos para os AcMs anti-OPN.	47
Tabela 4.3 – Concentração otimizada e eficiência de reação dos oligonucleotídeos iniciadores selecionados para RT-qPCR.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AcMs	Anticorpos monoclonais
ADE	Potencialização dependente de anticorpo (do inglês, <i>antibody-dependent enhancement</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BLAST	Ferramenta de busca de alinhamento local (do inglês, <i>basic local alignment search tool</i>)
BLASTp	<i>Protein</i> BLAST
tBLASTn	<i>Translated</i> BLAST
BSA	Albumina bovina sérica (do inglês, <i>bovine serum albumin</i>)
C	Proteína do capsídeo
Cas9	Proteína 9 associada a CRISPR (do inglês, <i>CRISPR associated protein-9</i>)
Cat. No.	Número de catálogo
CMC	Carboximetilcelulose
CO ₂	Gás carbônico
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas interespaçadas e regularmente agrupadas (do inglês, <i>clustered regularly interspaced short palidromic repeats</i>)
crRNA	CRISPR RNA
DAPI	4',6'-diamidino-2 fenilindol
DENV	<i>Dengue virus</i>
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>desoxyribonucleic acid</i>)
E	Proteína de envelope
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fc	Fração cristalizável
FFU	Unidade formadora de foco (do inglês, <i>focus forming unit</i>)
g	Gramas
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDC-0449	Vismodegib

H ₂ O	Água
HDR	Reparo direcionado por homologia (do inglês, <i>homology-directed repair</i>)
<i>HPRT</i>	Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase
ICTV	Comitê internacional de taxonomia de vírus (do inglês, <i>international committee on taxonomy of viruses</i>)
IEDB	Base de dados de epítomos imunes (do inglês, <i>immune epitope database</i>)
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	Quilobase
kDa	Quilodaltons
L	Litro
Lac-Z	β-lactamase
LB	<i>Luria Broth</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μmol	Micromol
M	Proteína de membrana
mAbs	Anticorpos monoclonais (do inglês, <i>monoclonal antibodies</i>)
MFI	Média de intensidade de fluorescência (do inglês, <i>Mean fluorescence intensity</i>)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês, <i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NBT	Nitro azul tetrazólio
NCBI	Centro nacional para informação biotecnológica (do inglês, <i>national center for biotechnology information</i>)
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
NS	Proteína não estrutural

OPN	Osteopontina
ORF	Fase aberta de leitura (do inglês, <i>open reading frame</i>)
PAM	Motivo protoespaçador adjacente (do inglês, <i>protospacer adjacent motif</i>)
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PFU	Unidade formadora de placa (do inglês, <i>plaque forming unit</i>)
PNH	Primatas não humanos
pr	Proteína precursora
PX459	plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
RNP	Complexo ribonucleoprotéico (do inglês, <i>ribonucleoprotein</i>)
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa (do inglês, <i>reverse transcription quantitative PCR</i>)
SAG	Agonista de Smoothened (do inglês, <i>smoothened agonist</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SFB	Soro fetal bovino
sgRNA	RNA guia único (do inglês, <i>single-guide RNA</i>)
<i>SPP1</i>	Fosfoproteína 1 secretada (do inglês, <i>secreted phosphoprotein 1</i>)
TA	Temperatura ambiente
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
tracrRNA	Transativador de crRNA (do inglês, <i>transactivating crRNA</i>)
U	Unidades
V	Volts
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 DENGUE	1
1.2 OSTEOPONTINA.....	5
1.2.1 Papel da osteopontina na infecção por DENV	10
1.2.2 Ferramentas de estudo	11
1.2.2.1 <i>Anticorpos monoclonais</i>	12
1.2.2.2 <i>Células deficientes na expressão de osteopontina</i>	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 SOLUÇÕES, MEIOS E GÉIS	17
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-OSTEOPONTINA	17
3.2.1 Isotipagem dos anticorpos monoclonais e verificação da estabilidade dos hibridomas.....	17
3.2.2 Imunoflorescência indireta em placa	18
3.2.3 Imunofluorescência indireta em lâmina	19
3.2.4 Western Blot.....	20
3.2.5 Citometria de fluxo	21
3.2.6 Análises <i>in silico</i>	21
3.3 GERAÇÃO DE LINHAGEM A549 DEFICIENTE EM OPN UTILIZANDO CRISPR-CAS9	22
3.3.1 Transfecção do RNP	22
3.3.2 Transfecção com plasmídeo (PX459)	30
3.4 MODULAÇÃO INDIRETA DA EXPRESSÃO DA OPN PELA MODULAÇÃO DA VIA HEDGEHOG	33
3.5 DINÂMICA DE MODULAÇÃO DA OSTEOPONTINA DURANTE A INFECÇÃO PELO DENV.....	34
3.5.1 Estoque viral.....	34
3.5.2 Cinética de infecção em células A549.....	35
3.5.2.1 <i>Quantificação dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR</i>	36
4 RESULTADOS	38

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-OSTEOPONTINA	38
4.1.1 Análises <i>in silico</i>	44
4.2 GERAÇÃO DE LINHAGEM A549 DEFICIENTE EM OPN UTILIZANDO CRISPR-CAS9	48
4.2.1 Transfecção do RNP	48
4.2.2 Transfecção com plasmídeo (PX459)	53
4.3 MODULAÇÃO INDIRETA DA EXPRESSÃO DA OPN PELA MODULAÇÃO DA VIA HEDGEHOG	56
4.4 DINÂMICA DE MODULAÇÃO DA OSTEOPONTINA DURANTE A INFECÇÃO PELO DENV	58
4.4.1 Estoque viral	58
4.4.2 Cinética de infecção em células A549	59
4.4.2.1 <i>Quantificação dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR</i>	60
5 DISCUSSÃO	62
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-OSTEOPONTINA	62
5.2 GERAÇÃO DE LINHAGEM A549 DEFICIENTE EM OPN UTILIZANDO CRISPR-CAS9	65
5.3 MODULAÇÃO INDIRETA DA EXPRESSÃO DA OPN PELA MODULAÇÃO DA VIA HEDGEHOG	67
5.4 DINÂMICA DE MODULAÇÃO DA OSTEOPONTINA DURANTE A INFECÇÃO PELO DENV	68
5.4.1 Cinética de infecção em células A549	68
6 CONCLUSÕES	69
7 PERSPECTIVAS	69
8 REFERÊNCIAS	70
9 APÊNDICE A	78
10 APÊNDICE B	79
11 APÊNDICE C	80
12 APÊNDICE D	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 DENGUE

A dengue é uma doença infecciosa não contagiosa (BRASIL, 2016) que se alastrou amplamente pelos trópicos e constitui um sério problema de saúde pública global (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019a). Sem tratamento específico (BRASIL, 2019), as comunidades médicas e científicas buscam desenvolver uma solução preventiva ou terapêutica para a doença (CRUZ *et al.*, 2013).

A dengue é ocasionada por um vírus cuja partícula viral é constituída de ácido ribonucleico (RNA) de polaridade positiva, três proteínas estruturais e um envelope lipídico (KNIPE; HOWLEY, 2013). A classificação definida pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) em 2019 define o vírus da dengue como pertencente ao domínio *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Kitrinoviricota*, classe *Flasuviricetes*, ordem *Amarillovirales*, família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, espécie *Dengue virus* (DENV).

Envoltas por uma estrutura lipídica, as partículas virais possuem aproximadamente 50 nm de diâmetro. A camada externa é composta pela proteína de envelope (E) e a proteína de membrana (M), derivada do processamento da proteína precursora de membrana (prM). O vírus possui ainda um pequeno nucleocapsídeo formado pela proteína do capsídeo (C) e uma fita única de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11 kb (Figura 1.1A). O RNA viral é composto por um *cap* (m⁷GpppAmN) na sua extremidade 5' que confere estabilidade a molécula permitindo sua tradução. A molécula apresenta uma única fase aberta de leitura (do inglês, *open reading frame*, ORF) com aproximadamente 3400 códons, flanqueada por regiões não codificadoras nas extremidades 5' e 3' (Figura 1.1 B) (KNIPE; HOWLEY, 2013).

Os flavivirus entram na célula do hospedeiro por endocitose, a partir do reconhecimento por receptores de membrana. Os receptores não são bem caracterizados devido ao uso de diferentes estratégias de entrada em diferentes tipos celulares e ao emprego de mais de uma molécula do hospedeiro neste processo. Sabe-se que DENV é reconhecido por glicosaminoglicanas altamente sulfatadas, lectinas tipo-C e proteínas de choque térmico, como GRP78 (BIP) e Hsp90/Hsp70 (KNIPE; HOWLEY, 2013). Outro fator que auxilia a infecção por DENV em células que

possuem receptor para fração cristalizável (Fc) das imunoglobulinas, é a opsonização das partículas virais por anticorpos subneutralizantes, resultando em um aumento da infecção através da potencialização dependente de anticorpo (do inglês, *antibody-dependent enhancement*, ADE). Este tipo de reconhecimento ocorre mais frequentemente em pacientes que já foram previamente infectados com outro sorotipo de DENV e é associado ao desenvolvimento de forma grave da doença (KNIFE; HOWLEY, 2013).

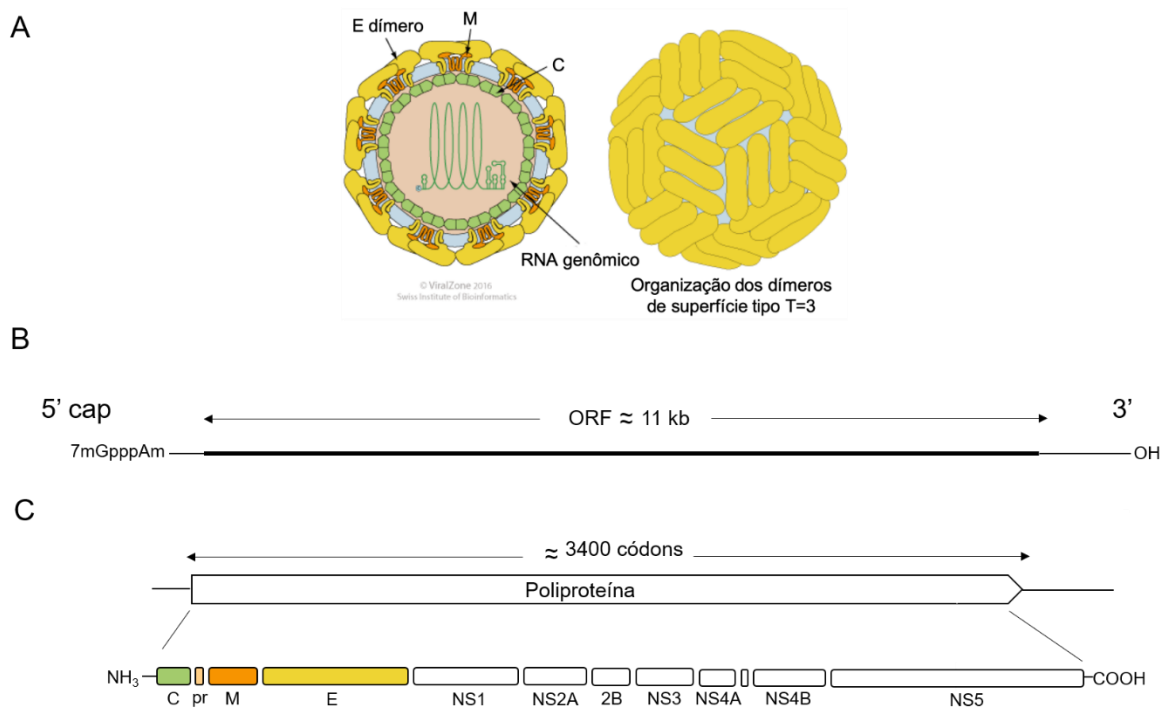


Figura 1.1 – Estrutura genômica e proteica do DENV. A) Partícula viral. Fonte: reproduzido de ViralZone (https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species) com adaptações sob licença CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). B) O RNA viral contém uma única ORF flanqueada por regiões não codificadoras em ambas as extremidades e um *cap* em sua extremidade 5'. C) Processamento da poliproteína. Caixas abaixo da poliproteína indicam proteínas maduras geradas pela cascata de processamento proteolítico. Proteínas estruturais estão coloridas de verde, laranja e amarelo, enquanto as proteínas não estruturais (NS) estão em branco. Fonte: Autoria própria, 2020.

Após o vírus ser internalizado, a fusão da membrana celular e viral ocorre na via de maturação do endossomo inicial até o endossomo tardio. No ambiente ácido a proteína E, glicoproteína composta por três domínios, sofre modificações conformacionais, expondo o peptídeo de fusão, o qual é inserido na membrana endossomal. Após a fusão, o genoma viral liberado no citoplasma serve de substrato para tradução da única ORF presente no genoma. Este processo resulta na síntese de um longo polipeptídeo que é clivado em 10 proteínas (Figura 1.1C). As proteínas não estruturais (NS) recrutam o genoma viral para o complexo de replicação,

sintetizando uma fita de RNA negativa que servirá como base para transcrição de novos genomas de DENV. A partícula viral começa a ser montada quando dímeros da proteína C se associam ao RNA viral recém-sintetizado e juntos se ligam a membranas do retículo endoplasmático que contém o complexo prM-E. Posteriormente, as partículas virais imaturas são transportadas através da via secretora. Quando a prM é exposta ao pH ácido da vesícula trans-Golgi o sítio de clivagem de furina fica exposto, assim a prM é processada em pr e M. Entretanto, o fragmento pr só se dissocia da partícula viral quando ela é exposta ao pH neutro do ambiente extracelular, resultando assim na partícula viral madura (KNIPE; HOWLEY, 2013).

Relatos históricos, do ano de 1779 mencionam DENV na Ilha de Java (BRASIL, 2001) e em 1780 um surto febril foi descrito por Benjamin Rush na cidade de Filadélfia (EUA), sendo esse considerado o primeiro relato de uma epidemia atribuída ao DENV (KNIPE; HOWLEY, 2013). O vírus foi isolado em 1943 pela primeira vez (HOTTA, 1952), período no qual também foram descritos a existência de diferentes sorotipos (SABIN, 1952). Nos séculos XVIII e XIX infecções por DENV eram comuns na América do Norte, Austrália, Ásia e regiões caribenhas (KNIPE; HOWLEY, 2013). Durante a segunda guerra mundial diversos sistemas ecológicos foram perturbados, aliado ao crescimento e urbanização pós-guerra e às crises econômicas globais o DENV foi amplamente distribuído pelo mundo através da disseminação do seu vetor (HALSTEAD, 1988).

Considerada uma arbovirose (do inglês, *arthropod borne virus*), a doença é essencialmente transmitida por mosquitos infectados das espécies *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* (KNIPE; HOWLEY, 2013), atualmente encontrados principalmente em regiões tropicais (HALSTEAD, 1988) e subtropicais, as quais possuem condições que favorecem o seu desenvolvimento (BRASIL, 2001). O vírus é mantido na natureza através de dois ciclos de transmissão: urbano e silvestre. O primeiro consiste na transmissão do DENV a humanos a partir da picada de mosquitos fêmeas infectados do gênero *Aedes*. Os indivíduos infectados, por sua vez, constituem fonte de infecção de novos mosquitos (Figura 1.2). O segundo, consiste na infecção de primatas não humanos (PNH) por DENV através da picada de mosquitos infectados. Da mesma forma, os PNH infectados podem servir como fonte de infecção de novos mosquitos (KNIPE; HOWLEY, 2013). Uma vez infectados, após período de incubação extrínseca,

que varia de 10 a 14 dias, os mosquitos podem transmitir o vírus durante toda sua vida (BRASIL, 2001).

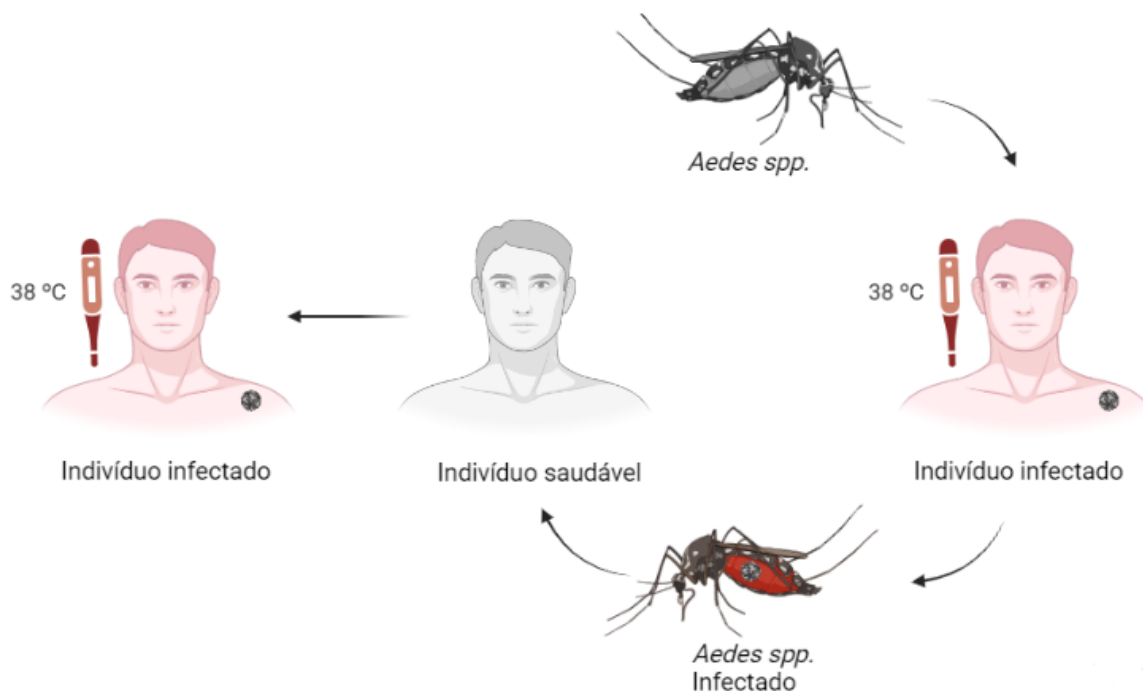


Figura 1.2 – Ciclo de transmissão urbano da dengue. Criado com: BioRender.com. Autoria própria, 2021.

A infecção com o DENV pode ser assintomática ou causar sintomas que podem evoluir para resolução ou agravar-se (BRASIL, 2016). A sintomatologia da dengue inicia-se com febre alta, dores musculares intensas, mal-estar, dor ao movimentar os olhos, dor de cabeça, falta de apetite e manchas avermelhadas pelo corpo (BRASIL, 2019). A doença pode progredir para sintomas mais severos, estágio normalmente acompanhado da diminuição da febre. Os sintomas associados são: dor abdominal severa, vômito persistente, respiração rápida, sangramento nas gengivas, fadiga, inquietação e presença de sangue no vômito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Quando a doença progride para um caso grave é possível observar manifestações hemorrágicas, choque hipovolêmico e disfunção grave de órgãos (BRASIL, 2016) podendo culminar em morte (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Nas Américas, o Brasil é o país que mais contribui com casos notificados (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019) sendo uma região hiperendêmica, na qual há a circulação de todos os sorotipos da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). No país há evidências de epidemias por DENV desde 1923 no Rio de Janeiro, porém sem confirmação laboratorial. A primeira confirmação

laboratorial ocorreu em 1982, em Boa Vista, Roraima, na qual foram isolados DENV-1 e DENV-4 (OSANAI *et al.*, 1983). Após 1986 epidemias de DENV tem ocorrido em todo o país (BRASIL, 2001), com surtos explosivos acontecendo a cada 4 ou 5 anos (FIOCRUZ, 2021), acumulando mais de 10 milhões de casos notificados (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2021).

Considerada uma importante arbovirose (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006), responsável por aproximadamente 100-400 milhões de infecções por ano no mundo (CHEN; DIAMOND, 2020), com custo estimado de 8,9 bilhões de dólares anuais (SHEPARD *et al.*, 2016), não há um tratamento específico para dengue (BRASIL, 2001). Há uma vacina licenciada em aproximadamente vinte países, Dengvaxia (CYD-TDV), produzida pela empresa Sanofi Pasteur (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Trata-se de uma vacina tetravalente que possui como base a cepa vacinal do vírus da febre amarela na qual as proteínas prM e E foram substituídas pelas proteínas correspondentes dos quatro sorotipos de DENV (LOW; OOI; VASUDEVAN, 2017). A vacina é indicada apenas para indivíduos que já foram infectados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b), pois está associada a maiores riscos de hospitalizações em quem apresenta sua primeira infecção natural de dengue após a vacinação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Outras vacinas e novas terapias antivirais estão sendo desenvolvidas. O desafio é aplicar os conhecimentos adquiridos sobre a compreensão da replicação viral e os complexos mecanismos que levam à patogênese, a fim de prevenir e/ou controlar a dengue e suas manifestações graves (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Dentro desse contexto, proteínas celulares que possuem a expressão passível de modulação e desempenham papel relevante durante a infecção com o vírus da dengue, constituem potenciais alvos terapêuticos.

1.2 OSTEOPONTINA

A osteopontina (OPN), também conhecida como fosfoproteína secretada 1 (SPP1) e fator de ativação precoce dos linfócitos T (Eta-1) (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000; WU; WANG, 2019), é uma glicoproteína multifuncional, expressa por diversas células do corpo humano (PASCAPURNAMA *et al.*, 2017). Primeiramente descrita por Senger, Wirth e Hynes, 1979 como uma fosfoproteína de 58 kDa secretada por células transformadas (CRAIG; SMITH; DENHARDT, 1989; SENGER; PERRUZZI;

PAPADOPOULOS, 1989) a OPN foi posteriormente também identificada na matriz extracelular óssea (FRANZÉN; HEINEGÅRD, 1985) onde foi melhor caracterizada (OLDBERG; FRANZEN; HEINEGARD, 1986). Neste local, a proteína desempenha um papel no desenvolvimento ósseo através da afinidade da mesma pelos cristais de hidroxiapatita, (BOSKEY *et al.*, 1993), função da qual deriva seu nome. Do latim, “osteo” significa osso e “pons” significa ponte, assim, osteopontina representaria a possível ponte entre os cristais de hidroxiapatita na matriz extracelular e a célula (OLDBERG; FRANZEN; HEINEGARD, 1986)

O gene que codifica a OPN, *SPP1*, está localizado no cromossomo 4 (4q22.1) (YOUNG *et al.*, 1990) e se encontra agrupado com os genes de proteínas da família SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*), proteínas com as quais a OPN compartilha características bioquímicas e genéticas (FISHER *et al.*, 2001). Composta por sete éxons (Figura 1.3A): o éxon 1 da OPN é sempre não codificador, no éxon 2 encontram-se a parte restante da 5’UTR, o peptídeo sinal e os dois primeiros aminoácidos da proteína madura. A sequência consenso para fosforilação de caseína quinase II está contida no éxon 3 e no éxon 5, enquanto o único domínio significativamente positivamente carregado se encontra no éxon 4. Os principais domínios funcionais descritos da OPN são codificados pelos éxons 6 e 7 (BRIONES-ORTA *et al.*, 2017; FISHER *et al.*, 2001).

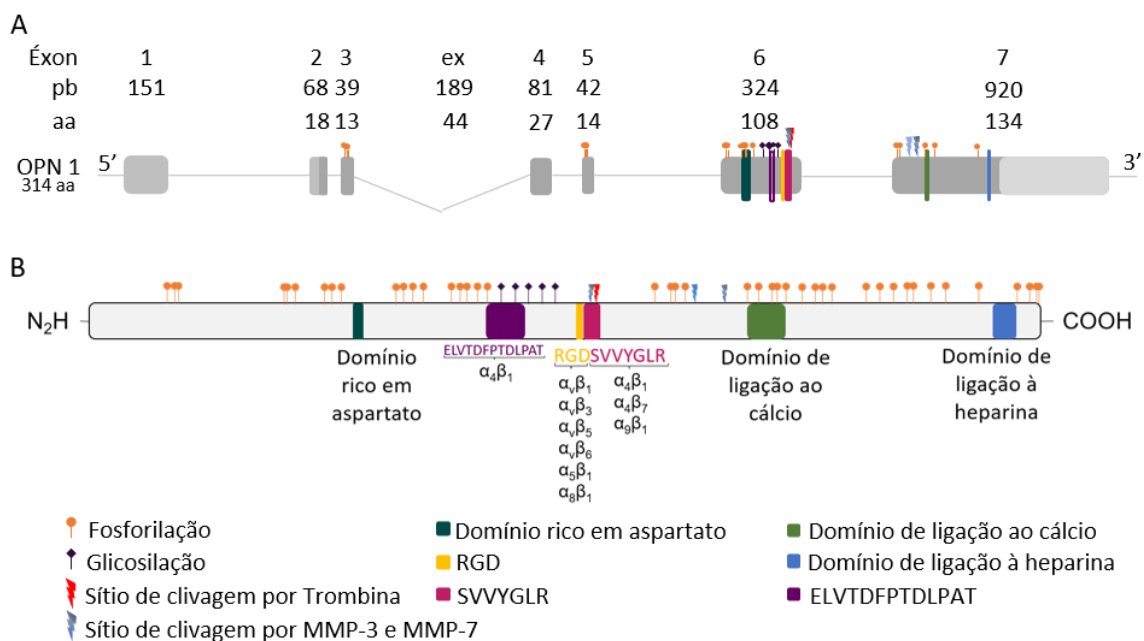


Figura 1.3 – Osteopontina e seus domínios. A) Estrutura genômica da OPN-a humana. Seis éxons são codificadores. Acima de cada éxon está indicado o número de pares de bases (pb) e de aminoácidos (aa) codificados. As caixas em cinza claro representam as regiões não traduzidas (UTRs) e as cinzas escuras as regiões codificadoras. B) Baseado na OPN humana canônica estão descritos os domínios altamente conservados que refletem suas variadas funções biológicas. Autoria própria, 2021.

Apresentando cadeia única de aproximadamente 300 aminoácidos (SUBRAMAN *et al.*, 2015), a OPN possui diversos domínios (Figura 1.3B) envolvidos nas funções celulares exercidas pela proteína, como os domínios de ligação à integrina. A OPN liga-se a uma variedade de integrinas, as quais são receptores transmembrana de adesão que medeiam as ligações célula-célula ou célula-matriz extracelular (HYNES, 1992). As integrinas se associam à OPN através de dois domínios encontrados em sequência: RGD e SVVYGLR (Arg-Gly-Asp e Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg) (GREEN *et al.*, 2001). Se ligam ao domínio RGD as integrinas: $\alpha_v\beta_1$ (HU *et al.*, 1995), $\alpha_v\beta_3$ (MEDHORA *et al.*, 1993), $\alpha_v\beta_5$ (HU *et al.*, 1995), $\alpha_v\beta_6$ (YOKOSAKI *et al.*, 2005), $\alpha_5\beta_1$ (YOKOSAKI *et al.*, 2005) e $\alpha_8\beta_1$ (DENDA; REICHARDT; MÜLLER, 1998). Após clivagem por trombina entre R168 e S169 (numeração baseada na proteoforma 1 ou OPN-a), o domínio críptico SVVYGLR que interage com $\alpha_4\beta_1$ (BAYLESS; DAVIS, 2001; WEBER, 2018), $\alpha_4\beta_7$ (GREEN *et al.*, 2001) e $\alpha_9\beta_1$ (WEBER, 2018; YOKOSAKI *et al.*, 1999, 2005) é exposto (Figura 1.3B). Na porção N-terminal são observados dois domínios extremamente conservados cujo cerne é a sequência SSEE (Ser-Ser-Glu-Glu). O segundo destes domínios contém resíduos de glutamina que constituem possíveis sítios alvo da enzima transglutaminase e logo a jusante um domínio rico em aspartato (WEBER, 2018). Na fração C-terminal são encontrados os domínios de ligação à heparina, ao receptor CD44 e ao cálcio (WEBER, 2018) (Figura 1.3B).

Expressa por diversas células a OPN pode ser encontrada em tecidos como: osso (FRANZÉN; HEINEGÅRD, 1985), cérebro, tecidos vasculares, vilosidades no útero e decídua, epitélios especializados encontrados na mama, glândulas salivares e sudoríparas, nos dutos biliares e pancreáticos, entre outros (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000). Também pode ser expressa por macrófagos, linfócitos ativados, células dendríticas, células *natural killer* e células B (CLEMENTE *et al.*, 2016).

A OPN pode ser encontrada em sua forma solúvel, atuando como uma citocina ou associada à matriz extracelular, promovendo adesão celular, pois se liga a diversas integrinas e a CD44 (BRIONES-ORTA *et al.*, 2017). Além disso, a OPN regula diversos sinais transcricionais e vias de sinalização, também contribui na remodelação de tecidos, modulando processos como: cicatrização, migração celular e crescimento ósseo (BRIONES-ORTA *et al.*, 2017) e parece estar envolvida na polarização da resposta imune celular, agindo como uma citocina indutora de células T auxiliares tipo 1 (Th1) (ASHKAR *et al.*, 2000). A OPN é um importante regulador da inflamação (VAN

DER WINDT *et al.*, 2010), podendo apresentar propriedades anti- ou pró-inflamatórias (INOUE; SHINOHARA, 2011). A Figura 1.4 ilustra algumas das vias de sinalização ativadas pela OPN em contextos fisiológicos e patológicos.

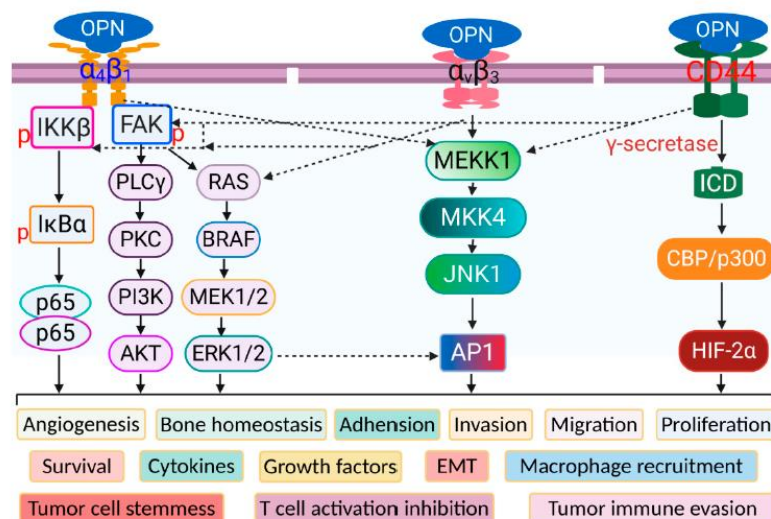


Figura 1.4 – Receptores da OPN e suas vias de sinalização. Os três principais domínios de interação com receptor da OPN se ligam aos seus respectivos receptores para ativar vias de sinalização distintas e sobrepostas, as quais regulam processos celulares sob condições fisiológicas e a progressão da doença sob condições patológicas, como câncer. Fonte: reproduzido de Moorman *et al.* (2020) sob licença CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

A forma intracelular da OPN, primeiramente identificada na periferia da membrana (ZOHAR *et al.*, 2000), é originada a partir da tradução de um códon de iniciação não canônico resultando na deleção da sequência sinal que direciona a proteína para o meio extracelular (SHINOHARA *et al.*, 2008). Sua função permanece pouco explorada (DEL PRETE *et al.*, 2019), no entanto parece estar envolvida no rearranjo do citoesqueleto, no progresso do ciclo celular, na remodelação neural e em vias de transdução de sinal posteriores aos receptores imunes inatos (INOUE; SHINOHARA, 2011).

As cinco diferentes proteoformas da OPN - formas moleculares diferentes de um produto proteico codificado por um único gene (SMITH; KELLEHER, 2013) - se originam através de *splicing* alternativo (Figura 1.5) e somente foram experimentalmente confirmadas em humanos (HE; MIRZA; WEBER, 2006; WEBER, 2018). A proteoforma 5 contém 8 éxons, um a mais que a proteoforma canônica, proteoforma 1 ou OPN-a, esse éxon a mais é originado da retenção de uma porção do íntron 3. As outras proteoformas sofrem *splicing* alternativo e perdem um ou dois éxons quando comparadas à forma canônica. A proteoforma 2 ou OPN-b perde o éxon

5, a proteoforma 3 ou OPN-c perde o éxon 4 e a proteoforma 4 perde os éxons 4 e 5 (BRIONES-ORTA *et al.*, 2017). Contudo, as proteoformas não canônicas ainda não foram observadas em tecidos saudáveis (WEBER, 2018).

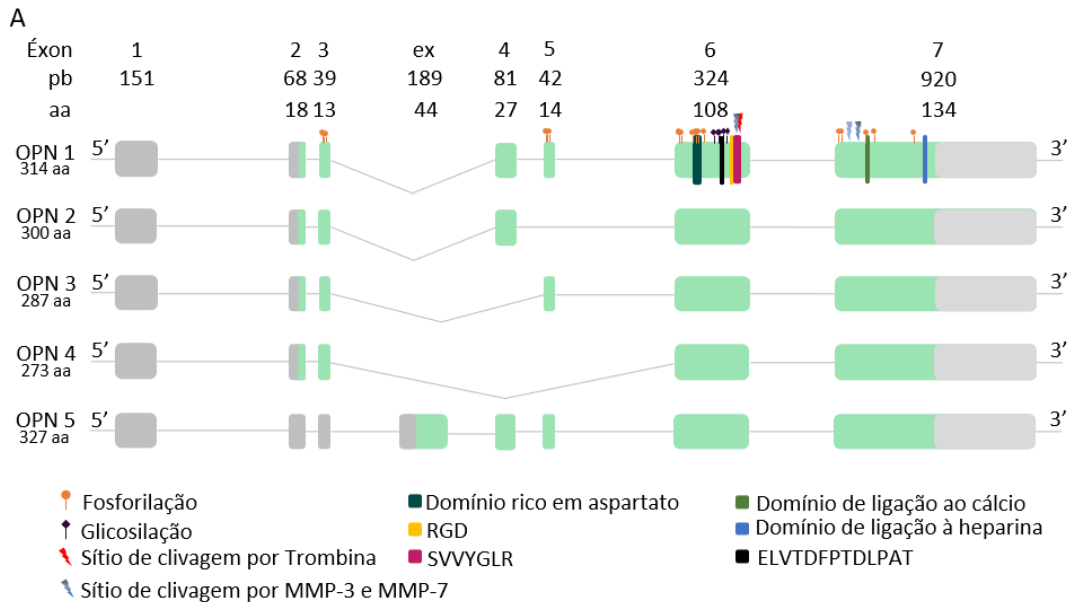


Figura 1.5 – Disposição de éxons e *splicing* das proteoformas de OPN. A proteoforma canônica OPN-a, formada por 7 éxons, está representada na parte superior como referência. Acima de cada éxon está indicado o número par de bases (pb) e de aminoácidos (aa) codificados. As caixas cinzas representam as regiões não traduzidas (UTRs) e as verde claras as regiões codificadoras. O *splicing alternativo* dos éxons 4 e 5 gera as proteoformas OPN-2, -3 e -4. A proteoforma OPN-5 retém um éxon extra (ex), localizado entre os éxons canônicos 3 e 4, e fornece à proteoforma um início de tradução alternativo, resultando em uma proteína maior. Fonte: Autoria própria, 2021.

A expressão de proteoformas resultantes de *splicing* alternativo está fortemente relacionada ao câncer e diversos trabalhos relatam a expressão de diferentes proteoformas relacionadas à progressão e metástase em diferentes tipos de câncer (BRIONES-ORTA *et al.*, 2017).

Sullivan *et al.* (2009) por exemplo, demonstram como a nicotina estimula a expressão da proteoforma 3 de OPN e induz uma resposta pró-metastática em células de adenocarcinoma ductal pancreático. Por sua vez, a super-expressão *in vitro* da proteoforma 1 em células de linhagem de câncer de pulmão de células não pequenas foi relacionada a um fenótipo mais agressivo, especialmente quando comparada com a expressão da proteoforma 3, implicando o éxon 4 como um importante regulador do potencial maligno deste tipo de câncer (GOPARAJU *et al.*, 2010). Por outro lado, a expressão da proteoforma 3 no câncer de mama está relacionada a maior malignidade do tumor. O éxon 4 pode exercer um papel crucial na solubilidade da OPN e uma vez ausente a proteoforma se mantém solúvel o que impede o crescimento ancorado das células, promovendo metástase (HE; MIRZA; WEBER, 2006). Em carcinoma

hepatocelular (HCC) foi demonstrado que a capacidade migratória das células depende da expressão diferencial das proteoformas de OPN, sendo a razão relativa entre as proteoformas 1, 2 e 3, um fator determinante para progressão e metástase. A expressão predominante das proteoformas 1 e 2 refletem um estágio pró-migratório, enquanto a proteoforma 3 está associada a um fenótipo não migratório e pró-sobrevivência (CHAE *et al.*, 2009)

A estrutura da proteína pode ainda ser alterada por modificações pós-traducionais, por exemplo fosforilações e sulfatações aumentam as características aniônicas da superfície enquanto glicosilações podem limitar a flexibilidade da OPN. Essas modificações podem alterar as funções biológicas da OPN (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000) e permitir a geração de proteoformas monoméricas distintas com massa molecular variada (GIMBA; TILLI, 2013). A expressão da OPN em tecidos e fluidos corporais não varia apenas em níveis proteicos, mas também em modificações pós-traducionais que são tecido e célula específicas, refletindo as diversas funções que a proteína exerce e o porquê de a mesma atuar em diferentes sistemas fisiológicos (CHRISTENSEN *et al.*, 2005).

1.2.1 Papel da osteopontina na infecção por DENV

Diferentes estudos demonstram a modulação da OPN durante a infecção com dengue. Moreno-Altamirano *et al.* (2004) observaram um aumento na expressão gênica de OPN em macrófagos derivados de monócitos humanos infectados com DENV-2 por 6 horas, mas não 24 horas pós-infecção, quando comparados a células não infectadas. Já Liew e Chow (2006) relatam a diminuição da expressão de OPN em 1,5 vezes através de análises de microarranjo em células ECV304 (células semelhantes a endoteliais) cinco dias após infecção com DENV-2. Esses dados corroboram aqueles encontrados através de análise por microarranjo de células dendríticas derivadas de monócitos humanos infectadas com DENV-3, no qual é observada a diminuição da expressão de OPN em 6, 12 e 24 horas pós-infecção (SILVEIRA *et al.*, 2011).

Chagan-Yasutan *et al.* (2014) relatam um aumento nos níveis plasmáticos de OPN em pacientes com febre da dengue ou dengue hemorrágica quando comparados a indivíduos saudáveis. Os níveis de OPN na fase aguda da doença estão aumentados e apresentam uma correlação positiva com hematócrito e negativa com

a contagem de plaquetas, podendo, portanto, refletir o nível de extravasamento de plasma durante esta fase da infecção. Em contrapartida, nos pacientes em fase de recuperação os níveis de OPN decaem. Quando a OPN sofre clivagem proteolítica pela trombina entre R168 e S169 é gerada a trOPN ou OPN-R. Os níveis de trOPN também aumentam consideravelmente na fase aguda da doença, porém continuam a subir na fase de recuperação da dengue em contraposição aos níveis de OPN não clivada. Na fase aguda da doença, a geração de trOPN está positivamente relacionada a carga viral e negativamente relacionada aos níveis do complexo trombina-anti-trombina (TAT), um marcador de ativação da coagulação. Na fase de recuperação, os níveis de trOPN estão negativamente relacionados tanto a contagem de plaquetas quanto aos níveis de TAT (CHAGAN-YASUTAN *et al.*, 2014; SUHARTI *et al.*, 2002).

Outro trabalho do mesmo grupo explorou o efeito inibitório da brefelamida e seu derivado de éter metílico sobre a OPN durante a infecção das linhagens celulares THP-1 e 293T com DENV-3, a qual induz a expressão da proteína. Os resultados deste estudo demonstram que a brefelamida e seu derivado contêm o aumento na expressão de OPN observado especialmente durante a infecção de células THP-1 com DENV-3. Em vista destes resultados os autores sugerem um potencial uso terapêutico destes compostos na prevenção da inflamação, fibrinólise e coagulopatia relacionadas a indução da expressão de OPN durante a infecção com DENV (PASCAPURNAMA *et al.*, 2017).

1.2.2 Ferramentas de estudo

Desenvolver ferramentas que auxiliam na pesquisa básica é de extrema importância para entender melhor qual é o papel de determinado gene, transcrito e/ou proteína não só no contexto da patologia estudada como também sua importância biológica.

No presente trabalho os anticorpos monoclonais (AcMs) anti-OPN e a geração de uma linhagem que não expresse a proteína em questão se tornaram importantes ferramentas a serem desenvolvidas e melhor caracterizadas para auxiliar na compreensão do papel da OPN e eventualmente de suas variantes, mais especificamente no contexto da infecção de células humanas pelo vírus da dengue. Entretanto, estas ferramentas têm o potencial de uso em outros estudos, inclusive

com foco em outras patologias ou contextos fisiológicos, nos quais o estudo da OPN seja relevante.

1.2.2.1 Anticorpos monoclonais

Uma importante ferramenta imunobiológica, AcMs são usados em diversos campos de estudo como: imunologia, bioquímica, biotecnologia, terapias e diagnóstico (ANSAR; GHOSH, 2013).

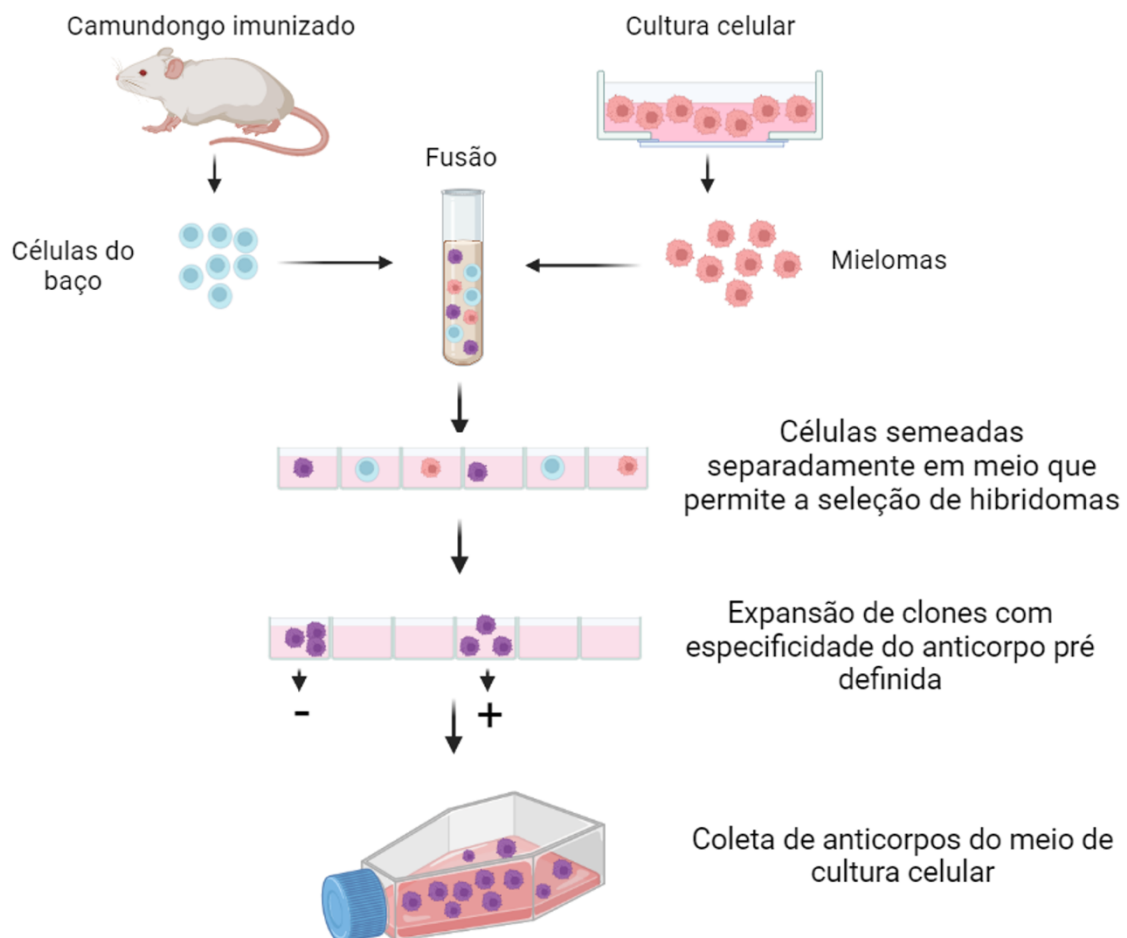


Figura 1.6 – Produção de hibridomas. As células B (células representadas em azul) são preparadas a partir do baço de camundongos previamente imunizados com um antígeno selecionado. Essas células são então fundidas com células de mieloma (células representadas em vermelho). O produto desta fusão é denominado hibridoma (células representadas em roxo). As células são mantidas em cultura no laboratório em meio de seleção que permite o crescimento apenas dos hibridomas que são semeados de forma a obter clones individuais derivados de uma única célula. Os clones que produzem os anticorpos específicos são identificados e cultivados separadamente constituindo fonte ilimitada de um anticorpo altamente específico. Criado com: BioRender.com. Autoria própria, 2021.

A tecnologia de produção de AcMs a partir de hibridomas foi desenvolvida em 1975 por Georges Köhler e César Milstein e consiste na fusão de mielomas murinos com células B de um doador murino previamente imunizado (KÖHLER; MILSTEIN, 1975), a partir da qual as culturas de hibridomas são originadas (Figura 1.6). As

células híbridas são semeadas de forma altamente diluída a fim de obter clones individuais que são selecionadas quanto a sua capacidade de produzir anticorpos contra o imunógeno utilizado. Estas culturas de hibridomas selecionadas produzem anticorpos altamente específicos contra o imunógeno e podem se multiplicar indefinidamente, fornecendo AcMs, em grande quantidade (ALBERTS *et al.*, 2017).

Embora o investimento inicial para produção *in house*, “caseira”, de AcMs possa ser maior do que a aquisição do anticorpo comercial, uma vez obtido o hibridoma, a disponibilidade contínua do anticorpo torna a produção *in house* economicamente viável. A disponibilidade de AcMs proporciona uma ferramenta altamente específica que pode ser usada em diferentes técnicas de estudo (ANSAR; GHOSH, 2013), para detectar a presença do antígeno em determinada solução, célula ou tecido, para purificar o antígeno ou para mediar ou modular efeitos fisiológicos (LIPMAN *et al.*, 2005).

Mais especificamente em estudos que procuram desvendar a função de uma proteína específica, os anticorpos podem ser úteis em diferentes aplicações. Sua utilização em técnicas de microscopia de fluorescência e imunohistoquímica permite avaliar a localização celular ou distribuição tecidual das proteínas. Na microscopia confocal podem ser utilizados para verificar colocalização com outras proteínas e realizar inferências com relação a localização em compartimentos subcelulares e interações proteína-proteína. Seu uso em técnicas de imunoprecipitação tem aplicação em estudos proteômicos mais aprofundados que buscam esclarecer a composição de complexos proteicos ou redes de interação proteína-proteína. Seu emprego em técnicas de imunoblotting ou ELISA possibilita a identificação da proteína em determinada solução ou extrato permitindo inclusive a realização de análises quantitativas ou semi-quantitativas. Também podem ser utilizados para neutralizar ou ativar a proteína alvo em estudos funcionais. Dependendo de sua especificidade, os AcMs, em especial, podem inclusive ser utilizados no estudo de diferentes proteoformas e suas funções (LIPMAN *et al.*, 2005).

1.2.2.2 *Células deficientes na expressão de osteopontina*

Metodologias que viabilizam a edição de genomas, através do silenciamento ou deleção de genes tem um enorme potencial para auxiliar na compreensão do papel

de determinado gene/proteína tendo aplicação em estudos de pesquisa básica, medicina e biotecnologia (ANN RAN *et al.*, 2013).

Linhagens celulares deficientes na produção de uma proteína específica constituem uma importante ferramenta capaz de auxiliar nos estudos para desvendar o papel desta proteína, além de serem úteis em processos de validação da especificidade de anticorpos.

O recente desenvolvimento de metodologia de edição gênica utilizando o sistema de repetições palindrômicas curtas interespaçadas e regularmente agrupadas (CRISPR) e sua proteína associada 9 (Cas9) representa um grande avanço nesta área. A ferramenta foi desenvolvida a partir de um sistema CRISPR tipo II, originalmente descrito como um tipo de “sistema imune adaptativo” de bactérias implicado na defesa de infecções por bacteriófagos (vírus de bactérias). De maneira breve, o sistema CRISPR-Cas9 é constituído por uma endonuclease guiada por um duplex de RNA, denominado CRISPR RNA (crRNA), e pelo transativador de crRNA (tracrRNA). O crRNA determina o sítio alvo de clivagem através do pareamento de bases Watson-Crick, enquanto o tracrRNA medeia a interação entre o crRNA e a Cas9. Alterações na sequência do crRNA possibilitam a ação da Cas9 sobre diferentes alvos, sendo assim possível editar qualquer sequência de DNA de interesse. Com o uso de técnicas de engenharia genética, o complexo tracrRNA:crRNA pode ser convertido em uma única molécula de RNA, conhecida como RNA guia único (sgRNA). O sgRNA mantém as mesmas características do complexo original guiando a Cas9 às sequências de DNA alvo e possibilitando a edição do genoma. O mecanismo de edição gênica por sua vez é dependente da maquinaria de reparo de quebra de dupla fita da própria célula que após a clivagem do DNA promove o reparo ou através da união de extremidades não-homólogas (do inglês, *non-homologous end joining*, NHEJ), que podem gerar inserções ou deleções no genoma, ou pelo reparo direcionado por homologia (do inglês, *homology-directed repair*, HDR), que por recombinação a partir de um molde endógeno ou exógeno permite a correção do dano ao DNA ou ainda inserção de sequências exógenas (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

A ação do sistema CRISPR-Cas9 é dependente do motivo protoespaçador adjacente (do inglês, *protospacer adjacent motif*, PAM). Este motivo flanqueia a extremidade 3' do sítio alvo de DNA e dita o mecanismo de busca dos alvos de DNA

pela Cas9. Nas bactérias a sequência PAM é essencial para determinar se o DNA é pertencente ao seu organismo ou ao organismo invasor. O PAM é específico para cada ortólogo de Cas9 (HSU; LANDER; ZHANG, 2014), por exemplo, a sequência PAM reconhecida pela Cas9 de *Streptococcus pyogenes* é 5'-NGG enquanto a de *Staphylococcus aureus* é 5'-NNGRR.

No caso específico da osteopontina existem pelo menos três relatos na literatura de uso desta ferramenta para geração de linhagens deficientes na expressão desta proteína. Wei *et al.* (2018) executaram o nocaute da OPN em células-tronco de glioblastoma com a finalidade de investigar sua ação quimioatraente sobre macrófagos. Adams *et al.* (2019) efetuaram o nocaute de OPN em células KP4 (carcinoma pancreático humano) a fim de melhor compreender a relação entre o fator de transcrição GLI2 e a OPN no processo de tumorigênese. Hendley *et al.* (2021) realizaram o nocaute do gene *SPP1* em células HPDE6c7 (células do ducto pancreático humano) para entender a função do gene na fisiologia normal das células.

2 OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar ferramentas para o estudo do papel da OPN durante a infecção pelo vírus da dengue.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS

1. Aprofundar a caracterização dos anticorpos anti-OPN previamente gerados;
2. Gerar linhagens deficientes na produção de OPN;
3. Compreender a dinâmica de modulação da OPN durante a infecção pelo vírus da dengue.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES, MEIOS E GÉIS

Meio LB (Meio de cultura “*Luria Broth*” para *Escherichia coli*): 10 g/L bactotripton, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl;

Meio LB sólido: 10 g/L bactotripton, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl, 15 g/L agar;

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ .7H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄;

SDS-PAGE 13%: 13% acrilamida (33/0,9%), 400 mM Tris-HCl pH 8.8, 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,075% persulfato de amônio, 0,07% N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED);

STACKING: 4% acrilamida (33/0,9%), 120 mM Tris-HCl pH 6.8, 0,1% SDS, 0,075% persulfato de amônio, 0,07% TEMED;

Tampão da Fosfatase Alcalina (*AP Buffer*): 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂ (pH 9,5);

Tampão de transferência para *Western Blot*: 25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 20% metanol;

TBE: 89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA (pH 8.0);

TBS: 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-OSTEOPONTINA

3.2.1 Isotipagem dos anticorpos monoclonais e verificação da estabilidade dos hibridomas

Para caracterizar os AcMs anti-osteopontina previamente gerados no laboratório (779B311E, 850F49A, 1139D810G e 214911G), foi primeiramente realizada a isotipagem de acordo com as instruções do fabricante do kit SBA Clonotyping System-HRP (Cat. No. 5300-05, Southern Biotech).

A seguir, de forma a verificar a estabilidade das culturas de hibridomas, as culturas previamente congeladas em nitrogênio líquido, foram submetidas a descongelamento. Os criotubos foram incubados em banho maria a 37 °C até seu quase completo descongelamento. Na cabine de segurança biológica, 3 mL do meio

RPMI 1640 (Cat. No. 31800022, Gibco) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cat. No. 12657-029, Gibco) inativado (SFB), 2 mM glutamina (Cat. No. 25030-081, Gibco), 1 mM piruvato de sódio (Cat. No. S8636, Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina (Cat. No. 15140-122, Gibco) e 1,25 µg/mL anfotericina B (Cat. No. A2942, Sigma-Aldrich) foi utilizado para homogeneizar cada cultura de hibridoma separadamente. Posteriormente, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 600 x g, os sobrenadantes foram descartados e cada cultura de hibridoma foi ressuspensa com 3 mL do meio RPMI 1640 suplementado conforme descrito acima e adicionadas em um poço de uma placa de 6 poços. Para expansão os mesmos foram incubados em estufa a 37 °C, 5% CO₂. Por fim, os sobrenadantes foram coletados para testar sua reatividade contra uma linhagem celular que sabidamente expressa osteopontina, HeLa MZ (*Homo sapiens*, subclone gerado por Marino Zerial, Max Plank Institute), por imunofluorescência indireta (IFI) conforme descrito abaixo.

Para determinar a diluição ideal de cada anticorpo monoclonal a ser utilizada em cada técnica, os mesmos foram titulados seguindo as metodologias descritas nos itens “3.2.2 Imunofluorescência indireta em placa”, “3.2.4 Western Blot” e “3.2.5 Citometria de fluxo”.

3.2.2 Imunofluorescência indireta em placa

As células humanas da linhagem A549 (*Homo sapiens*, ATCC CCL-185), HeLa MZ e Huh-7.5 (BLIGHT; MCKEATING; RICE, 2002), mais as células da linhagem C6/36, originada de larvas do inseto *Aedes albopictus* (IGARASHI, 1978) foram plaqueadas em densidade de 1x10⁵ células por poço em placas de cultivo de 24 poços. Também foram testadas células tronco e células tronco induzidas por 21 dias para linhagem osteogênica (gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco do Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz Paraná) utilizando o protocolo de marcação pós-fixação e permeabilização descrito a seguir. Após 24 horas em cultivo as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando uma solução 1:1 de metanol e acetona a -20 °C por no mínimo 1 hora. A solução de metanol e acetona foi então descartada, as células foram mantidas a temperatura ambiente (TA) no fluxo laminar durante 15 minutos para secagem da monocamada e posteriormente incubadas a 37 °C com os sobrenadantes das culturas de hibridomas ou os AcMs

diluídos em PBS por 50 minutos no caso das células tronco e células tronco diferenciadas na linhagem osteogênica e 30 minutos para as demais linhagens celulares. Após três lavagens com PBS, para retirada dos anticorpos não ligados, as células foram novamente mantidas a TA por 15 minutos no fluxo laminar e submetidas à marcação com anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Cat. No. A10680, Thermo Fisher Scientific) diluído 1:400 em PBS. Os núcleos foram corados com 300 nM 4',6'-diamidino-2 fenilindol (DAPI, Cat. No. 422801, BioLegend ou Cat. No. D1306, Invitrogen). As células tronco e células tronco diferenciadas na linhagem osteogênica foram incubadas com a solução de anticorpo secundário contendo 300 nM DAPI por 40 minutos a 37 °C. As demais linhagens celulares foram incubadas por 30 minutos nas mesmas condições. As imagens foram obtidas na plataforma de microscopia confocal e eletrônica do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná) (RPT07C), usando o microscópio invertido Leica DMI 6000B conectado a uma câmera Leica DFC365 FX e foram visualizadas e processadas usando o software Leica Application Suite Advanced Fluorescence 3.1.0.

3.2.3 Imunofluorescência indireta em lâmina

As linhagens celulares, A549, HeLa MZ e Huh-7.5, foram plaqueadas a 1×10^5 células/poço em lamínulas (Cat. No. G13C, Glasscyto) estéreis inseridas em poços de uma placa de 24 poços. Após 24 horas em cultivo as células foram lavadas com PBS e fixadas por 20 minutos a TA utilizando 3% paraformaldeído (Cat. No. P6248, Sigma-Aldrich) em PBS. Posteriormente, foram lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas mediante incubação com 0,5% triton x-100 (Cat. No. X100, Sigma-Aldrich) em PBS a TA por 10 minutos sob agitação de 60 rpm. Novamente foram realizadas três lavagens com PBS e as células foram incubadas a TA por 1 hora sob agitação de 50 rpm em uma solução contendo 3% albumina bovina sérica (BSA, Cat. No. A4503, Sigma-Aldrich) em PBS (solução de bloqueio). Em seguida procedeu-se incubação por 1 hora em TA sob agitação de 50 rpm com os AcMs diluídos em solução de bloqueio. Após três lavagens em PBS com duração de 5 minutos sob agitação, foi realizada a marcação secundária com anticorpo anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Cat. No. A10680, Thermo Fisher Scientific) diluído na solução de bloqueio durante 1 hora em TA sob agitação suave de 50 rpm. As células foram lavadas com PBS três vezes com incubações de 5, 20 e 5 minutos e os núcleos

foram corados com 300 nM DAPI (Cat. No. 422801, BioLegend ou Cat. No. D1306, Invitrogen). Uma gota de ProLong Gold (Cat. No. P10144, Thermo Fisher Scientific) foi colocada em uma lâmina e a lamínula foi posicionada acima da mesma. As imagens foram obtidas na plataforma de microscopia confocal e eletrônica do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná) (RPT07C), usando o microscópio invertido Leica DMI 6000B conectado a uma câmera Leica DFC365 FX e foram visualizadas e processadas usando o software Leica Application Suite Advanced Fluorescence 3.1.0.

3.2.4 Western Blot

A fim de avaliar a reatividade dos AcMs contra a proteína recombinante utilizada para produção dos mesmos foi realizado um ensaio de *Western Blot*. Para este ensaio usamos osteopontina recombinante produzida no Laboratório de Biologia Estrutural e Engenharia de Proteínas do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná), gentilmente cedida pelo Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin. Primeiramente a OPN recombinante foi dosada com Bio-Rad Protein Assay (Cat. No. 500-006, Bio-Rad) segundo recomendações do fabricante. Ao gel SDS-PAGE 13% foi adicionado 1 µg/poço da proteína recombinante e 7 µL do marcador pré-corado PageRuler (Cat. No. 26617, Thermo Scientific). Após a corrida eletroforética, a proteína foi transferida do gel para uma membrana de nitrocelulose. A transferência foi realizada em cuba contendo tampão de transferência para *Western Blot* a 4 °C, 25 V por aproximadamente 18 horas. Foi realizada a confirmação da presença de proteína na membrana de nitrocelulose corando a mesma com solução Ponceau (0,5% Ponceau S, 1% ácido acético).

A membrana foi então descorada em água e bloqueada através de incubação por 30 minutos a TA em solução de TBS contendo 5% de leite em pó desnatado (TBS 5% leite). Após três lavagens com TBS a membrana foi incubada com os AcMs (779B311E, 850F49A, 1139D810G e 214911G) ou com o anticorpo monoclonal comercial anti-osteopontina 7C5H12 (Cat. No. MA5-17180, Invitrogen) diluídos em TBS 5% leite por 1 hora. Em seguida as membranas foram lavadas três vezes com TBS e incubadas por 1 hora a TA com anticorpo anti-IgM de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (A9688, Sigma-Aldrich) ou com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Cat. No. S372B, Promega) também diluídos em TBS

5% leite. Após nova lavagem, a revelação foi realizada utilizando solução reveladora contendo 165 µg/mL de BCIP e 330 µg/mL de NBT em *AP Buffer*.

3.2.5 Citometria de fluxo

Foram transferidas células das linhagens A549, C6/36 e AP61 (*Aedes pseudocutellaris*) (VARMA; PUDNEY; LEAKE, 1974), na concentração de 1×10^5 células/poço, para uma placa com fundo em U, as células foram fixadas com 100 µL de *Citoperm/Citofix* (Cat. No. 554714, BD) por 20 minutos em TA, centrifugadas 2 minutos a 2000 x g, lavadas com tampão de bloqueio (5% SFB, 1% soro humano – BioWhittaker, Lonza Bioscience – em PBS), e incubadas com anticorpo monoclonal comercial anti-osteopontina 7C5H12 (Cat. No. MA5-17180, Invitrogen) ou AcMs (779B311E, 850F49A, 1139D810G e 214911G) por 20 minutos, a 37 °C. A seguir foi realizada centrifugação por 2 minutos a 2000 x g, lavagem com 150 µL de *Perm/Wash Buffer* 1x (Cat. No. 554714, BD) e as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Cat. No. A10680, Thermo Fisher Scientific) por 20 minutos, a 37 °C. Por fim as células foram centrifugadas, lavadas mais duas vezes com *Perm/Wash Buffer* 1x (Cat. No. 554714, BD) e ressuspensas em 100 µL de paraformaldeído 1,5% (Cat. No. P6248, Sigma-Aldrich) em PBS. Foi analisada a percentagem de células expressando osteopontina através de técnicas de citometria de fluxo (FACSCanto II Flow Cytometer, BD) na plataforma de citometria de fluxo da rede de Plataformas tecnológicas da Fiocruz (RPT08L). Os resultados foram analisados usando o software FlowJo versão 10.0.7.r2 (BD) e posteriormente plotados sob a forma de gráficos utilizando o programa Prism 8.0 (GraphPad Software).

3.2.6 Análises *in silico*

Para investigar a existência de um possível ortólogo da OPN em mosquitos do gênero *Aedes*, foi realizada uma busca na base de dados do GenBank usando a ferramenta tBLASTn (*translated Basic Local Alignment Search Tool*, National Center for Biotechnology Information, NCBI) com base na sequência da proteoforma a ou variante 1 da OPN (número de acesso no GenBank: NP_001035147.1) contra sequências de organismos do gênero *Aedes* (taxid: 7158). A busca foi realizada tanto mantendo os parâmetros padrão do algoritmo quanto usando parâmetros menos

rigorosos que permitiriam a busca de sequências mais divergentes. Os parâmetros que foram modificados foram: matriz de substituição (BLOSUM45 ou PAM 250), *expect treshold* (0,5), *word size* (2) e *gap costs* (existence: 13, extension: 2 ou existence: 11, extension: 3).

Uma análise para predição de possíveis epítomos de células B foi realizada utilizando ferramentas disponíveis na *Immune epitope database* (IEDB, <https://www.iedb.org/>). A predição *in silico* de epítomos lineares foi efetuada com base na sequência proteica da proteoforma a ou variante 1 da OPN (número de acesso no UniProtKB: P10451) pelos métodos: Bepipred Linear Epitope Prediction, Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0, Chou & Fasman Beta-Turn Prediction, Emini Surface Accessibility Prediction, Karplus & Schulz Flexibility Prediction, Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity e Parker Hydrophilicity Prediction. A sequência dos epítomos preditos em quatro ou mais métodos que possuíam 7 resíduos de aminoácidos serviram de base para uma busca na base de dados do GenBank usando a ferramenta BLASTp (*Protein BLAST*, NCBI, parâmetros alterados: *Max target sequences non-default value*: 5000, *Matrix non-default value*: BLOSUM90) contra sequências de organismos do gênero *Aedes* (taxid: 7158).

3.3 GERAÇÃO DE LINHAGEM A549 DEFICIENTE EM OPN UTILIZANDO CRISPR-CAS9

Foram utilizadas duas estratégias distintas com o intuito de gerar células deficientes na expressão de OPN fazendo uso do sistema CRISPR-Cas 9. A primeira estratégia se baseou na transfecção do complexo ribonucleoprotéico (RNP, sgRNA + Cas9) e a segunda estratégia se baseou na transfecção de um plasmídeo (PX459) a partir do qual é transcrito o sgRNA e o RNA mensageiro (mRNA) para síntese de Cas9 na célula alvo.

3.3.1 Transfecção do RNP

Sequências oligonucleotídicas que nos permitam sintetizar *in vitro* os sgRNAs, que direcionam a proteína Cas9 para sequência alvo, foram desenhadas para serem utilizadas seguindo a metodologia descrita por Medeiros *et al.* (2017). Três éxons diferentes foram escolhidos como alvo: éxon 2, éxon 6 e éxon 7 (Figura 3.1). Como esses éxons são compartilhados pelos cinco transcritos codificadores de OPN

acredita-se que a edição de qualquer uma destas sequências alvo teria potencial de silenciar a expressão de todas as proteoformas da OPN.

Para síntese *in vitro* do sgRNA, constituído pelo crRNA e tracrRNA, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar sob a forma de DNA o molde para transcrição *in vitro*.

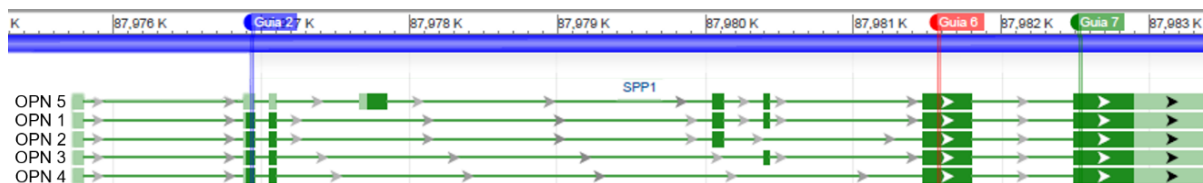


Figura 3.1 – Localização das sequências alvo no gene *SPP1*. As sequências homólogas aos crRNAs estão indicadas com uma legenda na parte superior em azul (Guia 2), vermelho (Guia 6) e verde (Guia 7). Os íntrons estão representados por linhas e as regiões não codificadoras e codificadoras dos éxons em verde claro e escuro, respectivamente. Imagem gerada usando o Genome Data Viewer (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=6696>). Autoria própria, 2021.

A sequência do crRNA (Figura 3.2) foi amplificada precedida da sequência do promotor da T7 RNA polimerase (viabiliza a síntese *in vitro* do sgRNA) e seguida da sequência do tracrRNA (requerida para a interação do crRNA com a Cas9). A sequência molde para o tracrRNA foi previamente gerada pela Dra. Lia Carolina Almeida Soares de Medeiros Kuczera a partir da hibridização dos oligonucleotídeos SaCas9gscafoligoF e SaCas9gscafoligoR (Figura 3.2) seguida de extensão com Taq DNA polimerase. As condições de amplificação para os fragmentos referentes ao sgRNA foram as seguintes: 10 µL do tampão 10x da LongRange (Cat. No. 201203, QIAGEN), 0,5 mM de uma solução de deoxinucleotídeos, 0,04 U/µL de mix de enzimas LongRange (Cat. No. 201203, QIAGEN), 3 µM do oligonucleotídeo iniciador de polaridade positiva, 0,3 µM do oligonucleotídeo iniciador de polaridade negativa (sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados pode ser consultada na Tabela 3.1) e 2 ng da sequência de tracrRNA previamente gerada pela Dra. Lia Carolina Almeida Soares de Medeiros Kuczera. O volume da reação foi completado para 100 µL usando água livre de nucleases. As condições de ciclagem foram as seguintes: 93 °C por 3 minutos, 1 vez; 93 °C por 30 segundos, 66,5 °C por 30 segundos e 68 °C por 25 segundos, 35 vezes (ProFlex 3x32-Well PCR System, Thermo Fisher Scientific).

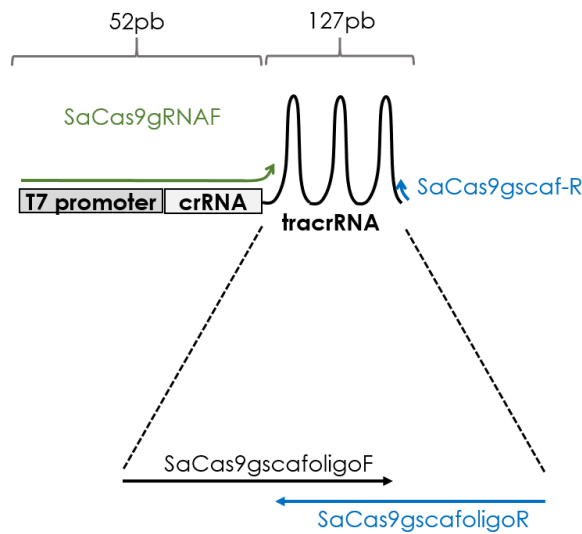


Figura 3.2 – Estratégia de amplificação do molde para transcrição *in vitro* do sgRNA. Para a amplificação da sequência contendo a sequência do promotor da T7 RNA polimerase e o sgRNA foi utilizada como molde a sequência do tracrRNA, um oligonucleotídeo iniciador de polaridade positiva (SaCas9gRNAF, seta verde) constituído pela sequência do promotor da T7 RNA polimerase, seguida da sequência do crRNA e da sequência inicial do tracrRNA (46 primeiros nucleotídeos) e um oligonucleotídeo iniciador de polaridade negativa com homologia aos 30 últimos nucleotídeos do tracrRNA (SaCas9gscaf-R, seta azul). Fonte: ilustração de Ana Luiza Pamplona Mosimann.

Tabela 3.1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese do molde dos sgRNAs.

Primer	Sequência 5' – 3'
Éxon 2 SaCas9gRNA2F (<i>sense</i>)	GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCATCACCTGTGC CATACCAGTTTTAGTACTCTGTAATTTTAGGTATGAGGTAGACGA AAATTGTA
Éxon 6 SaCas9gRNA5F (<i>antisense</i>)	GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGACATCAGAGTCGTTTC GAGTCAAGTTTTAGTACTCTGTAATTTTAGGTATGAGGTAGACGA AAATTGTA
Éxon 7 SaCas9gRNA6F (<i>sense</i>)	GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGATCACCTCACACATG GAAAGCGGTTTTAGTACTCTGTAATTTTAGGTATGAGGTAGACGA AAATTGTA
SaCas9gscaf-R	AAAAAATCTCGCCAACAAGTTGACGAGAT

sense = sequência alvo localizada na fita de polaridade positiva, *antisense* = sequência alvo localizada na fita de polaridade negativa. Autoria própria, 2019.

Os produtos purificados referentes aos moldes para síntese dos sgRNAs foram transcritos com o MEGAscript T7 Transcription Kit (Cat. No. AM1334, Ambion). No dia seguinte, foram adicionados 15 µL de acetato de amônio, 115 µL H₂O livre de nucleases e 375 µL de etanol livre de RNases e as soluções foram homogeneizadas e incubadas a -20 °C por 16-18 horas. Após este período foram centrifugadas 20 minutos a 4 °C na velocidade máxima (25314 x g), o sobrenadante foi descartado e os sgRNAs foram lavados com 200 µL de 70% etanol livre de RNases, novamente foram centrifugados nas mesmas condições e o sobrenadante descartado. Os RNAs

procurou-se usar quantidades equivalentes dos produtos de PCR purificados referente a sequência a jusante e a sequência a montante.

As sequências correspondentes aos produtos de PCR podem ser consultadas no APÊNDICE A. Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 2%, contendo 0,2 µg/mL brometo de etídio e separados em corrida eletroforética em tampão TBE. Os produtos que apresentaram banda única foram purificados com o *High Pure PCR Product Purification Kit* (Cat. No. 11732676001, Roche) e os demais com *QIAquick Gel Extraction Kit* (Cat. No. 28115, QIAGEN), de acordo as instruções do fabricante.

Tabela 3.2 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para síntese de DNA doador.

Produto	Sequência dos primers 5' – 3'
DNA doador - éxon 2	Up2F: AAATATATTTTATTTGTGATCATTTTG Up2R: <u>GCCGTCGTTTTACACTATCTATCTATAGGAGGCAAAGC</u> AAATCACTGCA Down2F: <u>TAGATAGTGTA AAAACGACGGCCAGTACAGTTGCATCT</u> TAAAGAAAATTCC Down2R: ATGCTTACCTGCTTTTCCTCAGA ACTT
DNA doador - éxon 6	Up5F: TGCTATAAAGGCTAAGGGAAAATAAAA Up5R: <u>GCCGTCGTTTTACACTATCTATCTACCTGGCTGTCCACA</u> TGGTCATCATC Down5F: <u>TAGATAGTGTA AAAACGACGGCCAGTATGTAGATGACA</u> CTGATGATTCTCA Down5R: CCTCAGTCCATAAACCACACTATCA
DNA doador - éxon 7	Up6F: TTAAACTAAATGAGATGACATATGTGA Up6R: <u>GCCGTCGTTTTACACTATCTATCTAGGATGGGAATATGG</u> TAATCCTTTTC Down6F: <u>TAGATAGTGTA AAAACGACGGCCAGTTGAATGGTGCAT</u> ACAAGGCCATCCC Down6R: GCTTATATAATCTGGACTGCTTGTGGC

Nota: os nucleotídeos que constituem a região de sobreposição entre os produtos do PCR Up e PCR Down encontram-se sublinhados. Autória própria, 2021.

Os produtos que correspondem ao DNA doador foram inseridos em vetor pUC18-TA preparado no próprio laboratório segundo protocolo de Marchuk *et al.* (1991), considerando uma razão molar vetor:inserto de 1:3 como ideal. A ligação foi realizada em volume final de 10 µL utilizando 1 µL de T4 DNA ligase (Cat. No. M1804, Promega), 5 µL 2x *buffer* (Cat. No. C671A, Promega), 41,9 ng do vetor e 208,5; 276,9; e 132,3 ng dos produtos da PCR de fusão correspondentes aos DNAs doadores tendo

como alvo os éxons 2, 6 e 7, respectivamente e incubada a 2-8 °C durante 16-18 horas. O produto da ligação foi transformado em *Escherichia coli* (*E. coli*) Top10F' (F'[lacI^q Tn10(tet^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻) quimio-competente (CaCl₂) preparada em nosso laboratório utilizando protocolo modificado de Mandel e Higa (1970). Todo volume da ligação foi adicionado a 100 μL de *E. coli* Top10F' quimio-competente, mantido em gelo por 30 minutos e depois submetido a um choque térmico por 2 minutos a 42 °C e em seguida, 2 minutos em gelo novamente. Por fim, foram adicionados 900 μL de meio LB e a mistura foi mantida sob agitação (200 rpm) a 37 °C por uma hora para recuperação das células transformadas. Após este período 200 μL das bactérias transformadas foram semeadas em placas de meio LB sólido contendo 100 μg/mL de ampicilina, 80 μg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (X-Gal) e 0,5 mM isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e incubadas a 37 °C de 16-18 horas. Esse vetor possui a sequência codificadora de β-lactamase (lacZ) que é descontinuada na presença do inserto, o que permite uma pré-triagem dos clones positivos (colônias brancas) pela cor das colônias na presença de IPTG e X-Gal. Foi feita uma placa mãe para a identificação de cada possível clone recombinante, que consistia em uma placa do mesmo meio sólido citado anteriormente com um papel quadriculado numerado colado no fundo. Os clones candidatos foram então transferidos da placa original para um quadrado numerado da placa mãe com o auxílio de um palito de dente estéril, em seguida a placa mãe foi incubada a 37 °C/16-18 horas. A triagem dos clones em potencial foi realizada pela técnica de PCR de colônia. Para isso colônias bacterianas foram transferidas para um microtubo identificado contendo 15 μL de H₂O ultra-pura com o auxílio de um palito de dente estéril. Os microtubos foram então incubados a 94 °C por 5 minutos, centrifugados a velocidade máxima (14100 x g) por 30 segundos e 1 μL do sobrenadante foi adicionado a 14 μL de mistura para PCR preparada de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante da Taq DNA polymerase (Cat. No. 10342-020, Invitrogen). Os parâmetros de ciclagem utilizados foram: 94 °C por 3 minutos 1 vez; 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por minuto por kb de produto, 35 vezes (ProFlex™ 3x32-Well PCR System, Thermo Fisher Scientific). Colônias contendo prováveis clones recombinantes foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo 100 μg/mL de ampicilina e crescidas a 37 °C por 16-18 horas sob

agitação constante (200 rpm). Uma porção do inóculo (500 µL) foi utilizada para preparação de estoques em 25% de glicerol estéril, armazenados a -80 °C. A minipreparação dos plasmídeos foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Protocol (Cat. No. A1330, Promega). Para confirmar a presença do inserto no DNA plasmidial foi realizada digestão com as enzimas KpnI (Cat. No. R0142L, New England Biolabs) e SphI (Cat. No. R0182L, New England Biolabs): 1 µL da minipreparação dos plasmídeos, 1 µL 10x NEBuffer 1 (100 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 1 µL 1 mg/ml BSA e 0,5 µL de cada enzima. O volume da reação foi completado para 10 µL com H₂O ultrapura e incubada a 37 °C por uma hora. Para amplificação do DNA das sequências dos DNAs doadores foi utilizado o mesmo protocolo de PCR descrito anteriormente, porém utilizando como molde o DNA resultante da minipreparação dos plasmídeos diluídos dez vezes. Os produtos foram purificados com o *High Pure PCR product purification kit* e dosados no equipamento Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific).

Foi realizada a transfecção da proteína SaCas9 (originada de *Staphylococcus aureus*), gentilmente cedida pela Dra. Lia Carolina Almeida Soares de Medeiros Kuczera, do sgRNA e do DNA doador para cada éxon alvo em células A549 (Tabela 3.3), utilizando o Amaxa Cell Line Nucleofector Kit T (Cat. No. VCA-1002, Lonza Bioscience), segundo recomendações do fabricante. A transfecção foi realizada novamente dois a três dias após a primeira, objetivando aumentar a eficiência do processo conforme relatado por Medeiros *et al.* (2017).

As células transfectadas foram incubadas a 37 °C, 5% CO₂, mantidas em meio DMEM-F12 (Cat. No. 12400024, Gibco), 7% SFB, suplementado ou não com antibiótico (25 µg/mL gentamicina, Cat. No. 1577190072, Gibco) e expandidas. Após expansão da cultura, foi realizado plaqueamento das células em placas de cultura de 96 poços (0,5 a 0,7 células/poço) de modo a obter culturas clonais deficientes na expressão do gene alvo. Nessa etapa foi adicionado meio DMEM-F12 condicionado às células para proporcionar um meio que favorecesse o crescimento das células plaqueadas em baixa densidade. O meio condicionado consiste no sobrenadante de cultura de células A549 não transfectadas que se encontravam em cultivo já por 2-3 dias. Os poços que continham apenas uma célula foram expandidos.

As culturas celulares transfectadas com o RNP referente ao éxon 2 foram submetidas ao teste *MycoAlert mycoplasma detection kit* (Cat. No. LT07-318, Lonza Bioscience), para verificação da presença de micoplasma nas culturas usando um *Lucetta Luminometer* (Lonza Bioscience).

Tabela 3.3 – Quantidade dos componentes utilizados em cada transfecção.

sgRNA adicionado	Quantidade (µg)	SaCas9 (20 µM)	DNA doador	Quantidade (ng)
sgRNA éxon 2	11,160	10 µL	DNA doador - éxon 2	148,5
sgRNA éxon 6	38,030	10 µL	DNA doador - éxon 6	254,4
sgRNA éxon 7	44,302	10 µL	DNA doador - éxon 7	198,7

Autoria própria, 2021.

A reatividade das células contra os AcMs 779B311E e 1139D810G foi avaliada através de IFI, conforme descrito acima. As culturas que possuíam regiões de reatividade negativa foram selecionadas para diluição limitante ou plaqueamento em baixa densidade (0,5-0,7 células/poço) e novo teste de reatividade. As células também foram testadas por PCR *semi-nested*, com base na amplificação da sequência alvo ou da sequência do DNA doador (Figura 3.4). A amplificação foi realizada de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante da Taq DNA polymerase (Cat. No. 10342-020, Invitrogen), empregando os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes às sequências a jusante e a montante do éxon alvo (Tabela 3.2), e 10-20 ng de DNA das possíveis células deficientes na expressão da OPN. O DNA celular foi extraído com o *Blood & Tissue DNA Mini Kit* (Cat. No. ID: 21, Ludwig Biotecnologia), segundo recomendações do fabricante. Os parâmetros de ciclagem utilizados foram: 94 °C por 3 minutos 1 vez; 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por minuto por kb de produto, 35 vezes (ProFlex 3x32-Well PCR System, Thermo Fisher Scientific). A seguir, 1 µL do produto desta primeira PCR foi adicionado a 14 µL da reação de PCR contendo os oligonucleotídeos iniciadores da sequência a jusante ou a montante do éxon alvo (Tabela 3.2) mais oligonucleotídeos iniciadores que somente anelam na sequência intacta do gene alvo (OPN) (Tabela 3.4) ou oligonucleotídeos iniciadores que anelam na sequência do DNA doador inserida por HDR (Tabela 3.4), nas mesmas condições de ciclagem.

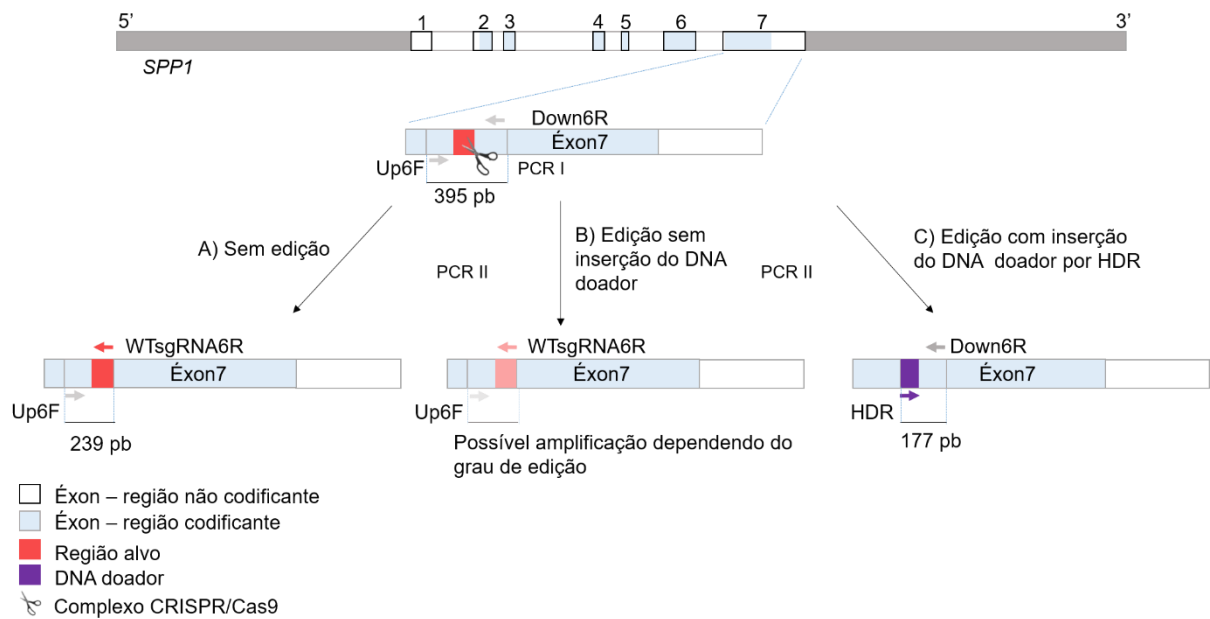


Figura 3.4 – Representação esquemática da PCR *semi-nested*. Na parte superior está ilustrada a organização gênica da OPN. Logo abaixo está ilustrada a região amplificada pela PCR I utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Up6F e Down6R. Na parte inferior estão ilustrados os possíveis cenários resultantes da edição da sequência alvo presente no éxon 7 do gene *SPP1*. A) Esquema da amplificação que visa identificar sequências alvo sem edição utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Up6F e WTsgRNA6R. B) Edição sem inserção do DNA doador. C) Esquema da amplificação que visa identificar sequências alvo com edição e inserção do DNA doador por HDR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores HDR e Down6R. Fonte: Autoria própria, 2020.

Tabela 3.4 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para PCR *semi-nested*.

Primer	Sequência 5' – 3'
WTsgRNA6R	CGCTTTCCATGTGTGAGGTGA
WTsgRNA5R	TTGACTCGAACGACTCTGATG
WTsgRNA2R	TGGTATGGCACAGGTGATGCC
HDR	TAGATAGATAGTGTAACGACGGCCAGT

3.3.2 Transfecção com plasmídeo (PX459)

Esta estratégia se baseia no protocolo descrito por Ann Ran *et al.* (2013). Inicialmente foram identificados sítios alvo no gene *SPP1* utilizando a ferramenta *CRISPR gRNA Design tool* (<https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input>) e *GPP sgRNA Designer* disponível no site do Broad Institute (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgRNA-design>). Com base neste resultado, foram desenhados três pares de oligonucleotídeos possuindo diferentes sequências alvo, essas sequências são compartilhadas pelos cinco transcritos codificadores de OPN e a edição de qualquer alvo teria potencial de silenciar a expressão de todas as proteoformas da OPN. A sequência dos pares de oligonucleotídeos corresponde a sequência de cada uma das fitas de DNA da

sequência alvo, contendo extremidades 3' coesivas BbsI compatíveis com as geradas pela digestão do plasmídeo PX459 (pSpCas9(BB)-2A-Puro - Addgene plasmid ID: 62988) com esta enzima. Os pares de oligonucleotídeos foram hibridizados e foi realizada a fosforilação das extremidades 5', empregando 5 µM do oligonucleotídeo de polaridade positiva, 5 µM do oligonucleotídeo de polaridade negativa, 1 mM ATP, 1 U de T4 Polinucleotídeo Kinase (Thermo Fischer Scientific) em *buffer* A para T4 Polinucleotídeo Kinase (Thermo Fischer Scientific) em volume final de 20 µL. A reação foi incubada 20 minutos a 37° C seguido de 10 minutos a 70° C para inativação da enzima. A ligação ao vetor PX459 (APÊNDICE B) previamente digerido com BbsI foi realizada adicionando 1 µL da reação anterior a 1 µL do *buffer* 10x da T4 DNA Ligase (Thermo Fischer Scientific), 1 µL de 5 U/µL T4 DNA Ligase (Thermo Fischer Scientific), 1 µL do PX459 (100 ng) digerido com BbsI, completando o volume da reação para 10 µL com água livre de nucleases e incubando por 1 hora a TA.

A transformação do plasmídeo foi realizada adicionando todo o volume da reação de ligação a 200 µL de *E. coli* Endura (Lucigen, *recA13 supE44 ara-14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20(Str^R) xyl-5 λ- leu mtl-1 F- mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻)*). A mistura foi incubada 30 minutos no gelo, 45 segundos a 37 °C e mais 2 minutos no gelo. Após foi adicionado 1 mL de meio LB líquido, a cultura de bactérias foi mantida sob agitação por 1 hora a 37 °C e todo volume foi plaqueado em meio LB sólido contendo 100 µg/mL ampicilina. A placa foi mantida a 37 °C e no dia seguinte foi preparada a placa mãe como descrito anteriormente. Em seguida foi realizada a triagem das colônias contendo o inserto de interesse no vetor PX459 por PCR de colônia. Para isso foram utilizadas as seguintes condições 1x tampão da Taq DNA polimerase recombinante (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, Invitrogen), 0,2 mM solução de deoxinucleotídeos, 1,6 mM MgCl₂, 0,2 µM do *primer* de polaridade positiva, 0,2 µM do *primer* de polaridade negativa, 0,03 U/µL enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen). As condições de ciclagem foram as seguintes: 94 °C por 5 minutos, 1 vez; 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 25 segundos, 71 °C ou 60 °C ou 63 °C por 25 segundos e 72 °C por 30 segundos, 35 vezes; 72 °C por 5 minutos (ProFlex™ 3x32-Well PCR System, Thermo Fisher Scientific). As colônias positivas foram inoculadas em 12 mL de meio líquido LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e as culturas incubadas a 37 °C sob agitação por 16-18 horas. A purificação do DNA plasmidial por minipreparação foi realizada usando o kit de purificação de DNA plasmidial (Cat. No.

ID:22, Ludwig Biotecnologia) de acordo com as recomendações do fabricante e a inserção correta das sequências foi confirmada por sequenciamento utilizando a metodologia de Sanger. O sequenciamento foi realizado na plataforma de sequenciamento de DNA por eletroforese capilar (RPT01A) da Fiocruz/RJ e os resultados visualizados com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5.

A seguir foi realizada a transfecção dos plasmídeos (2 µg de DNA total) em células A549 (1x10⁶ células), utilizando o Amaxa Cell Line Nucleofector Kit T (Lonza Bioscience), de acordo com o recomendado pelo fabricante. As células transfectadas foram semeadas em um poço de uma placa de 6 poços com DMEM-F12, 7% SFB e mantidas a 37 °C, 5% CO₂. Dois dias pós-transfecção foi adicionada puromicina (2 µg/mL) ao meio de cultura para seleção das células com base na resistência ao antibiótico. As células selecionadas foram expandidas em cultura e posteriormente plaqueadas em uma densidade de 0,7 células/poço em placa de 96 poços de modo a obter culturas clonais deficientes na expressão do gene alvo. As culturas clonais assim obtidas foram então expandidas no mesmo meio suplementado com 0,025 mg/mL gentamicina a 37 °C, 5% CO₂. A expressão de OPN pelas células transfectadas foi avaliada por IFI conforme já descrito usando os AcMs 779B311E e 1139D810G.

A fim de verificar se houve edição gênica foi realizado sequenciamento das culturas celulares pós-seleção com puromicina, porém antes do protocolo de clonagem celular, utilizando a metodologia de Sanger. Para isso o DNA das células foi extraído utilizando o *Blood & Tissue DNA Mini Kit* (Cat. No. ID: 21, Ludwig Biotecnologia) seguindo as recomendações do fabricante. Para amplificação da região alvo foram utilizados como molde 100-200 ng de DNA, 1x tampão da Taq DNA polimerase recombinante (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, Invitrogen), 0,2 mM solução de deoxinucleotídeos, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µM do *primer* de polaridade positiva, 0,5 µM do *primer* de polaridade negativa, 0,03 U/µL enzima Taq DNA polimerase recombinante. As condições de ciclagem foram as seguintes: 94 °C por 5 minutos, 1 vez; 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 25 segundos, 35 vezes (ProFlex™ 3x32-Well PCR System, Thermo Fisher Scientific). Os produtos foram purificados com o *High Pure PCR product purification* kit e dosados no equipamento Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific). O sequenciamento foi realizado na plataforma de sequenciamento de DNA por eletroforese capilar (RPT01A)

da Fiocruz/RJ e os resultados visualizados com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5.

Foi também realizada uma avaliação preliminar da expressão do mRNA de OPN nas culturas clonais seguindo a metodologia descrita no item 3.5.2.1. O cálculo da porcentagem de nocaute foi baseado em metodologia descrita por Haimes e Kelley (2013).

3.4 MODULAÇÃO INDIRETA DA EXPRESSÃO DA OPN PELA MODULAÇÃO DA VIA HEDGEHOG

Com base no trabalho de Choi *et al.* (2014), os compostos Vismodegib (GDC-0449, Cat. No. S1082, Selleckchem.com) e Smoothened Agonist (SAG, Cat. No. S7779, Selleckchem.com) foram utilizados com a finalidade de indiretamente induzir ou inibir a expressão de OPN. A expressão gênica de OPN é induzida pela via Hedgehog sendo GDC-0449 um antagonista desta via atuando como inibidor de Smoothened enquanto SAG, como o nome indica, é agonista de Smoothened.

Os efeitos dos compostos sobre a expressão da OPN em células A459 e Huh-7.5 foram avaliados pela metodologia de *High Content Imaging* no equipamento Operetta CLS (PerkinElmer).

Tomando como base os ensaios descritos por Choi *et al.* (2014) foram testadas concentrações que abrangem a faixa de 0,78-50 $\mu\text{mol/L}$ para GDC-0499 e 0,04-3 $\mu\text{mol/L}$ para SAG. As células foram semeadas em uma concentração de $1,8 \times 10^4$ células por poço e no dia seguinte adicionado meio completo (DMEM-F12, 7% SFB e 0,025 mg/mL gentamicina), 0,5% DMSO em meio completo (controle negativo de viabilidade celular), diferentes concentrações dos compostos diluídos em 0,5% DMSO ou 10% DMSO em meio completo (controle positivo de viabilidade celular). As culturas foram incubadas por 48 horas, período equivalente a duração dos experimentos de cinética de infecção com DENV. Após este período de incubação, para fins de avaliação da expressão da OPN, as células foram fixadas com paraformaldeído 3% (Cat. No. P6148, Sigma-Aldrich) em PBS por 17 minutos a TA e permeabilizadas com 0,5% triton X-100 (Cat. No. X-100, Sigma-Aldrich) em PBS por três minutos. Após três lavagens com PBS foram incubadas com o soro pós-imune ou o AcM 779B311E por 30 minutos e lavadas três vezes com 0,05% Tween 20 (Cat. No. P5927, Sigma-Aldrich) em PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG e

IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Cat. No. A10680, Thermo Fisher Scientific). Por fim, as células foram lavadas três vezes com 0,05% Tween 20 (Cat. No. P5927, Sigma-Aldrich) em PBS e mantidas em PBS até a aquisição das imagens. As imagens foram obtidas utilizando o equipamento Operetta CLS e analisadas usando o software Harmony 4.8.

Em paralelo, foi avaliado o efeito citotóxico dos compostos usando duas metodologias complementares, a metodologia de brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Cat. No. 19265 5, United States Biochemical) e de vermelho neutro (Cat. No. 15250-061, Gibco) em células A549. De forma resumida as células foram semeadas em uma concentração de $1,8 \times 10^4$ células por poço, mantidas a 37 °C, 5% CO₂ e no dia seguinte adicionado meio completo, 0,5% DMSO em meio completo, diferentes concentrações dos compostos diluídos em 0,5% DMSO ou 10% DMSO em meio completo conforme descrito acima, utilizando o mesmo espectro de concentrações já descrito para os compostos. As culturas foram incubadas por 48 horas e o sobrenadante das mesmas foi descartado, foi adicionado 150 µL de 0,5 mg/mL MTT diluído em PBS ou 150 µL de 33 µg/mL vermelho neutro diluído em DMEM. As células foram incubadas 3 horas a 37 °C, 5% CO₂. Após este período o MTT foi descartado e foi adicionado 150 µL de isopropanol às células. Do mesmo modo o vermelho neutro foi descartado e 150 µL da solução de extração (50% etanol, 1% ácido acético em água) foi adicionada às células. O resultado da análise do efeito citotóxico com vermelho neutro foi detectado através da leitura na faixa de 540 nm com o equipamento Leitor Multidetecção Híbrido Synergy H1 (BioTeK) e as células anteriormente incubadas com MTT foram submetidas a leitura diferencial da absorbância em 570 nm e 650 nm com o mesmo equipamento.

3.5 DINÂMICA DE MODULAÇÃO DA OSTEOPONTINA DURANTE A INFECÇÃO PELO DENV

3.5.1 Estoque viral

O estoque viral de DENV-4 (LVR13/422, GenBank accession number: KU513441) foi crescido em células C6/36 e titulado pela metodologia de formação de foco em C6/36 modificada de Desprès, Frenkiel e Deubel (1993). A imunomarcação foi realizada após incubação com o anticorpo anti-flavivirus 4G2 diluído 1:200 e anticorpo

secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Cat. No. S372B, Promega) diluído 1:7500.

O mesmo estoque foi ainda titulado pela metodologia de formação de placa em células A549. As células foram semeadas em placas de 24 poços, 1×10^5 células por poço, e no dia seguinte inoculadas com 400 μ L das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) do estoque viral, realizadas em meio DMEM-F12, 0,025 mg/mL gentamicina e incubadas por 1 hora a 37 °C, 5% CO₂. Após o período de incubação os inóculos foram descartados e foi adicionado 500 μ L do *overlay* constituído de uma mistura 1:1 de 3,2% carboximetilcelulose (CMC, Cat. No. C4888, Sigma-Aldrich) e meio DMEM-F12 concentrado duas vezes, suplementado com 0,5 mg/mL gentamicina e 10% SFB. A placa foi vedada e mantida por 7 dias a 37 °C, 5% CO₂. Ao fim deste período o *overlay* foi descartado e as células lavadas três vezes com PBS, fixadas com 200 μ L de paraformaldeído 3% (Cat. No. P6248, Sigma-Aldrich) em PBS por 20 minutos, lavadas novamente mais três vezes com PBS e coradas por 20 minutos com solução de 0,8% cristal violeta, 0,5% NaCl e 10% formamida em etanol. Após o corante ser descartado a placa foi lavada em água corrente e o número de unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL) calculado.

3.5.2 Cinética de infecção em células A549

Células A549 foram semeadas em placa de 24 poços (1×10^5 células/poço) e infectadas com DENV-4 (LVR13/422) usando multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1; 1; 5 e 10. Para isto o estoque viral foi diluído em DMEM-F12, 25 μ g/mL gentamicina e utilizado um inóculo de 400 μ L. Após adição do inóculo a cultura foi incubada por uma hora a 37 °C, 5% CO₂. A seguir o inóculo foi descartado, a monocamada foi lavada três vezes com PBS estéril, foram adicionados 500 μ L/poço de DMEM-F12, 7% SFB, 25 μ g/mL gentamicina e as culturas foram mantidas por 6, 24 e 48 horas a 37 °C, 5% CO₂. Após os diferentes tempos o sobrenadante de cultura foi coletado e as células coletadas por tratamento com solução de 0,05% tripsina, 0,02% EDTA (Cat. No. 25300-054, Gibco). As células foram então centrifugadas 5 minutos a 600 x g e ressuspensas em 200 μ L de tampão de bloqueio (5% SFB, 1% soro humano - BioWittaker, Lonza Bioscience - em PBS) no qual foram mantidas 30 minutos. As células foram então transferidas para poços de uma placa de 96 poços com fundo em U, centrifugadas 2 minutos a 2000 x g, o sobrenadante foi descartado por inversão e

as células fixadas com 100 µL *Citoperm/Citofix* (Cat. No. 554714, BD) em TA por 20 minutos. Após a fixação as células foram centrifugadas 2 minutos a 2000 x g, lavadas com 100 µL de tampão de bloqueio, e incubadas com anticorpo monoclonal comercial anti-osteopontina 7C5H12 (Cat. No. MA5-17180, Invitrogen) ou anti-flavivirus 4G2 por 20 minutos, a 37 °C, ambos diluídos 1:200 em *Perm/Wash Buffer* 1x. A seguir foi realizada centrifugação por 2 minutos a 2000 x g, lavagem com 150 µL de *Perm/Wash Buffer* 1x (Cat. No. 554714, BD) e as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Cat. No. A10680, Thermo Fisher Scientific) na diluição 1:400 em *Perm/Wash Buffer* 1x por 20 minutos, a 37 °C. Por fim, as células foram centrifugadas, lavadas mais duas vezes com *Perm/Wash Buffer* 1x e ressuspensas em 100 µL de paraformaldeído 1,5% (Cat. No. P6148, Sigma-Aldrich) em PBS. A leitura foi realizada no equipamento FACS Canto II (BD) e a análise dos dados no software FlowJo versão 10.0.7.r2 (BD). Como controle foram utilizadas células não infectadas (MOCK) sem imunomarcacão, marcadas apenas com anticorpo secundário ou duplamente marcadas.

Posteriormente, a cinética de infecção de DENV-4 (1 MOI) em células A549 foi repetida seguindo o mesmo protocolo descrito acima para fins de avaliação da expressão do mRNA de OPN conforme metodologia descrita no item 3.5.2.1

3.5.2.1 *Quantificação dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR*

Para avaliar os níveis de expressão do mRNA da OPN o RNA das células A549 foi extraído conforme instruções do fabricante do *RNeasy Mini Kit* (Cat. No. 74106, QIAGEN), realizando o passo opcional de digestão com DNase. Após a extração foi realizada a quantificação do RNA no equipamento Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific) e avaliação da qualidade do RNA pela razão das absorbâncias a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}).

A concentração dos oligonucleotídeos iniciadores foi otimizada e a eficiência testada de acordo com o preconizado no manual do *SYBR Green Quantitative RT-PCR Kit* (Cat. No. QR0100, Sigma-Aldrich). A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho do *amplicon* podem ser consultados na Tabela 3.5. A localização gênica daqueles referentes ao gene *SPP1*, *GAPDH* e *HPRT* pode ser visualizada na Figura 3.5.

Tabela 3.5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na quantificação dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR.

Primers	Sequência 5'-3'	Tamanho do Amplicon
FMHPRTF	GACCAGTCAACAGGGGACAT	132 pb
FMHPRTR	CCTGACCAAGGAAAGCAAAG	
GAPDHF	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	149 pb
GAPDHR	TGGTTCACACCCATGACGA	
OPNF	GCCGAGGTGATAGTGTGGTT	100 pb
OPNR	TGAGGTGATGTCCTCGTCTG	

Autoria própria, 2021.

Todas as reações foram realizadas usando o *SYBR Green Quantitative RT-PCR Kit* (Cat. No. QR0100, Sigma-Aldrich) e incubadas no equipamento LightCycler 96 System (Roche) utilizando as seguintes condições de ciclagem: 43 °C 30 minutos; 94 °C 2 minutos; 94 °C 15 segundos, 60 °C 1 minuto, 40 vezes; seguido do passo de análise da curva de dissociação. Os dados foram analisados no LightCycler 96 Software 2.0 (Roche).

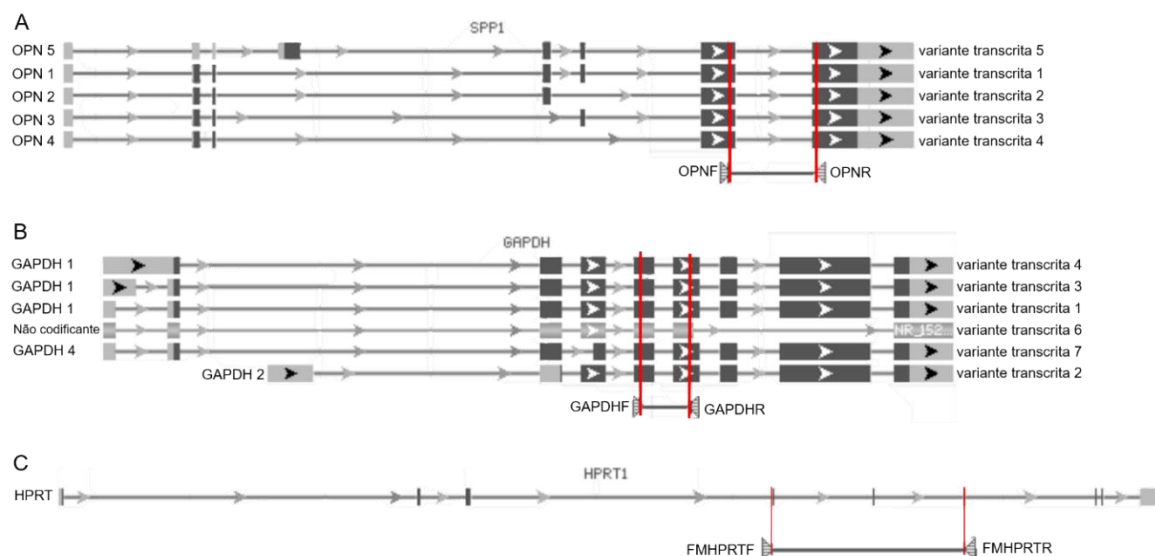


Figura 3.5 – Localização dos oligonucleotídeos iniciadores no gene. A) Os oligonucleotídeos iniciadores OPNF e OPNR anelam nos éxons 6 e 7, respectivamente em todas as variantes do gene *SPP1*. B) Os oligonucleotídeos iniciadores GAPDHF e GAPDHR anelam em éxons diferentes e detectam todas as variantes do gene *GAPDH*. C) Os oligonucleotídeos iniciadores FMHPRTF e FMHPRTR anelam nos éxons 4 e 6 do gene *HPRT1*, respectivamente. Autoria própria, 2021.

Para normalização dos dados foi adotada a metodologia de quantificação da expressão relativa dos transcritos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase (*HPRT*) como gene de referência.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-OSTEOPONTINA

Os AcMs usados neste trabalho foram previamente gerados no laboratório e obtidos pela concentração dos sobrenadantes de cultura dos hibridomas por precipitação com solução saturada de sulfato de amônio, seguida de ressuspensão e diálise em tampão PBS. A seleção dos anticorpos se baseou em uma pré-triagem dos sobrenadantes de cultura dos hibridomas por ELISA usando placas sensibilizadas com a proteína recombinante e confirmação por ensaio de imunofluorescência indireta em células HeLa MZ.

O primeiro passo para aprofundar a caracterização dos AcMs previamente gerados foi a realização de sua isotipagem a fim de verificar sua clonalidade e determinar seu isótipo. A metodologia utilizada se baseia em um ELISA de captura e os resultados podem ser consultados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Resultado isotipagem. Leitura de absorbância em 405 nm.

	Anti-Ig(H+L)	Anti-IgM	Anti-IgG1	Anti-IgG2a	Anti-IgG2b	Anti-IgG3	Anti-IgA	Anti-κ	Anti-λ
Controle positivo	1,901	1,23	1,875	0,803	1,436	1,125	0,966	0,576	0,558
Branco PBS BSA 1%	0,108	0,096	0,171	0,089	0,084	0,102	0,129	0,101	0,135
AcM 1139D810G	1,461	1,436	0,128	0,088	0,092	0,085	0,096	0,99	0,143
AcM 850F49A	1,107	1,259	0,113	0,074	0,09	0,076	0,082	0,774	0,099
AcM 214911G	0,773	1,064	0,141	0,081	0,078	0,094	0,074	0,682	0,099
AcM 779B311E	0,651	1,053	0,158	0,073	0,084	0,094	0,084	0,615	0,102

Como controle positivo foi utilizado o soro de camundongos imunizados com *Caaingua vírus* (TSCHÁ *et al.*, 2019). Autoria própria, 2019.

Ao analisar os resultados, podemos perceber uma maior absorbância na coluna dos poços sensibilizados com anti-IgM para todos os AcMs anti-OPN, indicando que os anticorpos possuem a cadeia pesada μ . Já com relação a cadeia leve, a absorbância foi maior na coluna dos poços sensibilizados com anti-κ, o que significa que essa é a cadeia leve dos anticorpos.

O teste de estabilidade dos hibridomas após congelamento e descongelamento das células mostrou que os mesmos continuam secretando os anticorpos monoclonais

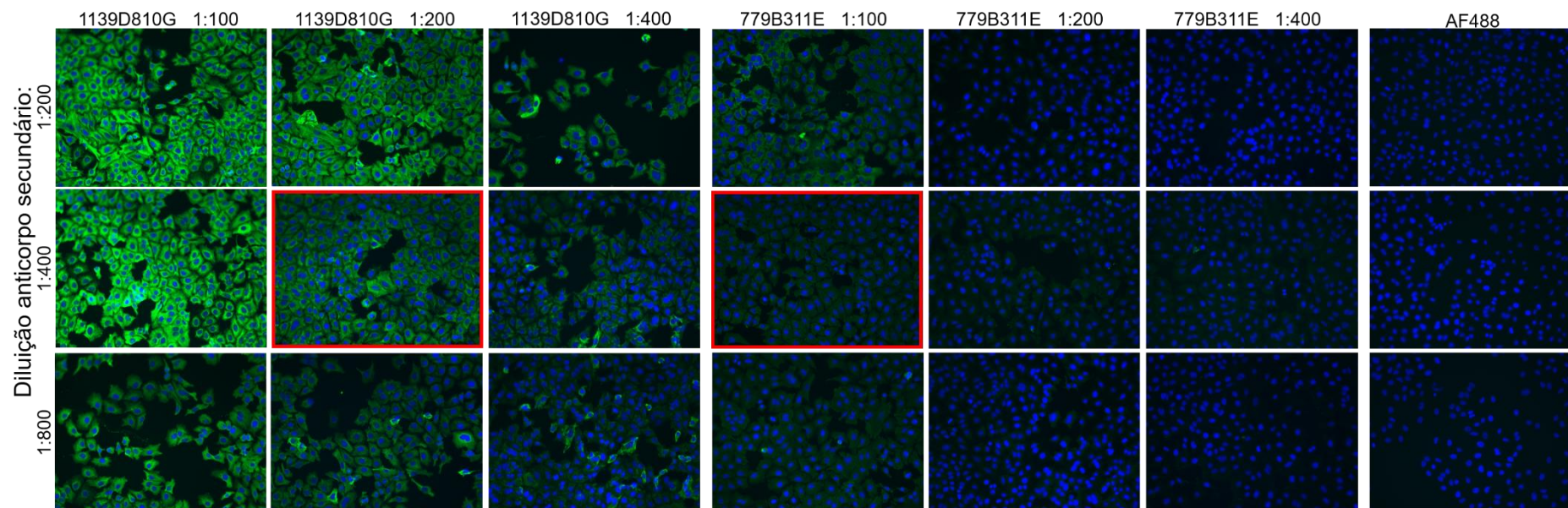


Figura 4.1 – Titulação dos anticorpos por IFI. Diferentes diluições dos AcMs foram testadas (1:100, 1:200 e 1:400) em combinação com diferentes diluições do anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (1:200, 1:400 e 1:800) (AF488) em células A549. Destacados em vermelho estão indicadas as diluições escolhidas. Como controle foi realizada a marcação utilizando apenas o anticorpo secundário (AF488). As fotos foram obtidas em aumento de 400x, usando um microscópio invertido Leica DMI 6000B. Autoria própria, 2021.

de interesse, uma vez que o sobrenadante coletado das culturas de hibridomas das quais cada um dos AcMs se origina apresentou reação positiva na IFI.

Foi escolhida a melhor diluição para utilização dos anticorpos nas diferentes técnicas através da titulação dos mesmos em células A549. Para as técnicas de IFI e de *High Content Imaging* foram selecionadas as diluições 1:100 para o AcM 779B311E, 1:200 para o AcM 1139D810G e 1:400 para o anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 em PBS (Figura 4.1).

Para uso na citometria de fluxo os anticorpos foram diluídos em *PermWash* 1x e selecionadas as diluições de 1:200 e 1:400 dos anticorpos monoclonal comercial e secundário anti IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488, respectivamente. A diluição de 1:100 foi determinada para o AcM 1139D810G. Como a percentagem de células que apresentaram marcação com o AcM 779B311E foi bastante distinta do observado com o anticorpo monoclonal comercial, optou-se pelo não uso deste anticorpo em experimentos posteriores utilizando citometria de fluxo (Figura 4.2).

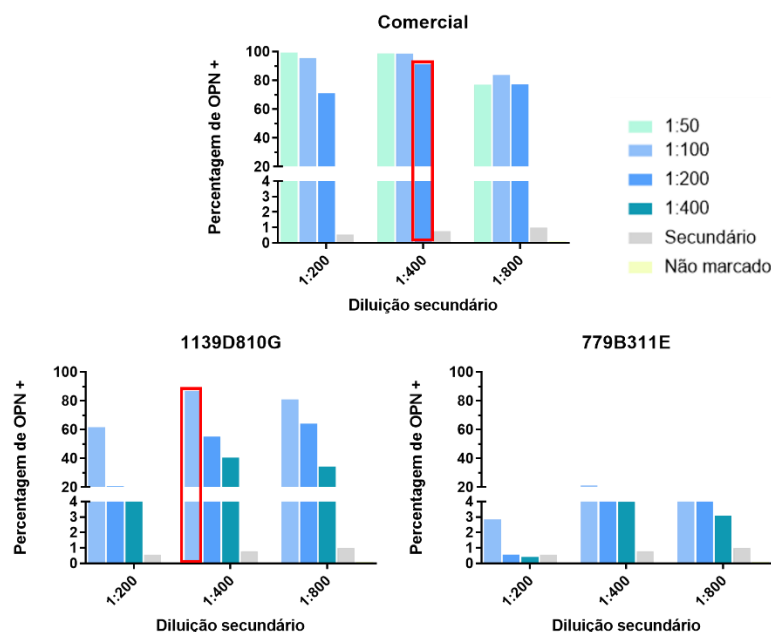


Figura 4.2 – Titulação dos anticorpos por citometria de fluxo. Diferentes diluições dos AcMs foram testadas (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) em combinação com diferentes diluições do anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (1:200, 1:400 e 1:800) (AF488) em células A549 por citometria de fluxo. Destacados em vermelho estão indicadas as diluições escolhidas. Como controle foi realizada a marcação utilizando apenas o anticorpo secundário (AF488) e como controle negativo células não marcadas. As barras indicam a média de um experimento com duas réplicas técnicas cada. Autoria própria, 2021.

Em relação a técnica de *Western Blot*, as diluições foram realizadas em TBS 5% leite, e selecionadas: 1:100 do AcM 779B311E associado a 1:60000 do anticorpo

secundário anti-IgM de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Cat. A9688) e 1:2000 do anticorpo monoclonal comercial, combinado a 1:15000 do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Cat. S372B) (Figura 4.3).

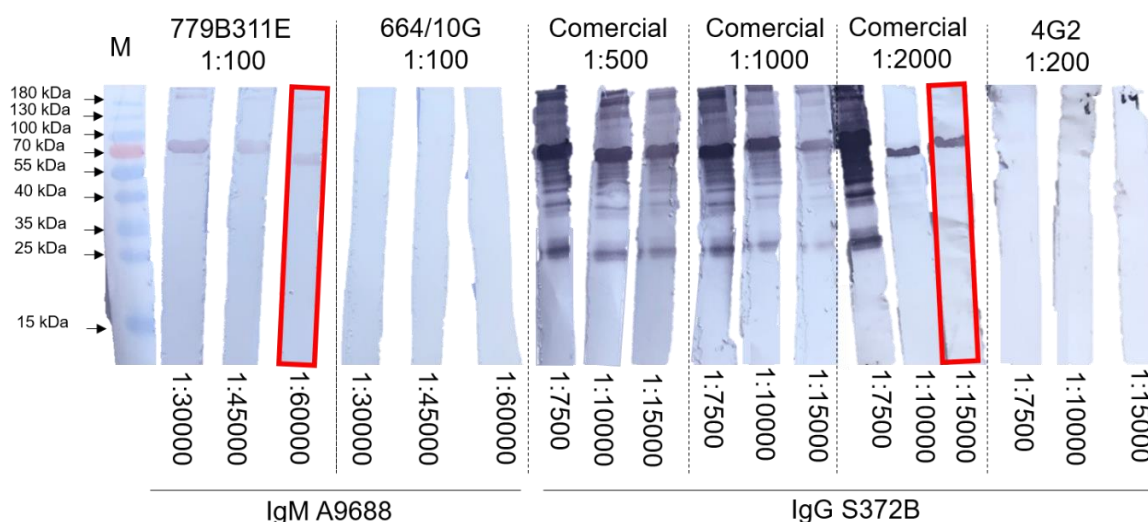


Figura 4.3 – Titulação de anticorpos por *Western Blot*. A banda vermelha representa a altura esperada da OPN recombinante ~70 kDa. O AcM 779B311E na diluição 1:100 foi testado em combinação com diferentes diluições do anticorpo secundário anti-IgM A9688 (1:30000, 1:45000 e 1:60000). Como controle de marcação foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-nucleoproteína de hantavírus 664/10G (MAZZAROTTO *et al.*, 2009) de mesmo isótipo (IgM_κ). O AcM comercial (7C5H12) nas diluições 1:500, 1:1000 e 1:2000 foi testado em combinação com diferentes diluições do anticorpo secundário anti-IgG S372B (1:7500, 1:10000 e 1:30000). Como controle de marcação foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-flavivírus 4G2 da mesma classe de imunoglobulinas (IgG). Também pode-se observar as diluições escolhidas destacados em vermelho. Autoria própria, 2021.

Conforme descrito na metodologia foram também realizadas IFIs em diferentes substratos celulares. Utilizando as linhagens A549, HeLa MZ e Huh-7.5 percebemos que os AcMs anti-OPN apresentam um perfil de reação diferente, tanto quando comparados entre si quanto nas diferentes linhagens (Figura 4.4). O AcM 850F49A apresentou o padrão de reatividade mais diferenciado, apresentando marcação apenas na linhagem HeLa MZ.

Células tronco não induzidas e induzidas para diferenciação osteogênica também foram testadas, uma vez que a osteopontina tem papel importante em processos de proliferação celular e foi inicialmente descrita como uma proteína de matriz extracelular óssea. O AcM 1139D810G parece reagir com maior intensidade com as células tronco quando comparado a sua reação com as células diferenciadas. Já o AcM 214911G parece ter marcação homogênea nas células diferenciadas ou não. O AcM 779B311E tem reatividade mais intensa com as células tronco do que com as células diferenciadas. Enquanto o AcM 850F49A apresentou apenas uma fraca reação com as células diferenciadas (Figura 4.5).

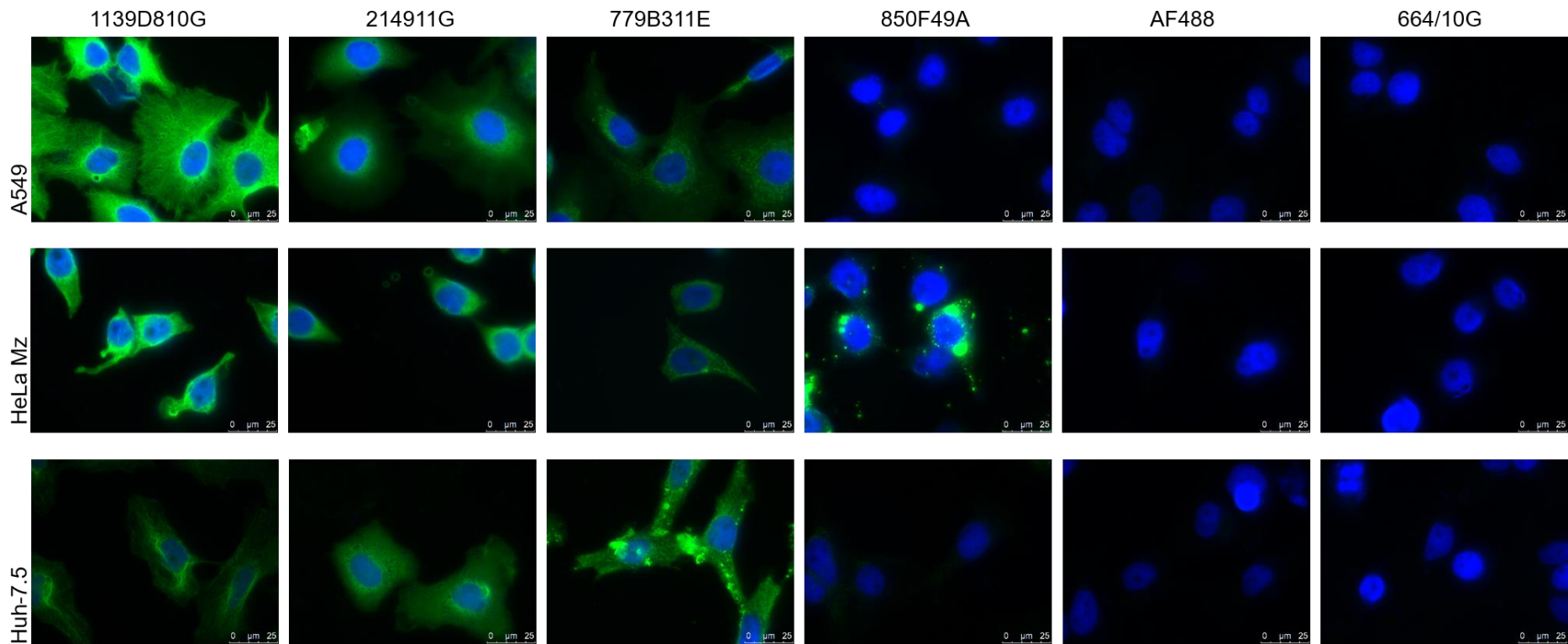


Figura 4.4 – Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-osteopontina nas linhagens A549, HeLa MZ e Huh-7.5. Os AcMs foram usados nas seguintes diluições em solução de bloqueio: 1139D810G – 1:50; 214911G – Puro; 779B311E - 1:100; 850F49A – 1:800; AF488 – 1:200 e 664/10G 1:50. Como controles de marcação foram utilizados um anticorpo monoclonal anti-nucleoproteína de hantavírus 664/10G (MAZZAROTTO *et al.*, 2009) de mesmo isótipo (IgM_κ) e marcação utilizando apenas o anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (AF488). As fotos foram tiradas com aumento de 1000x. Autoria própria, 2021.

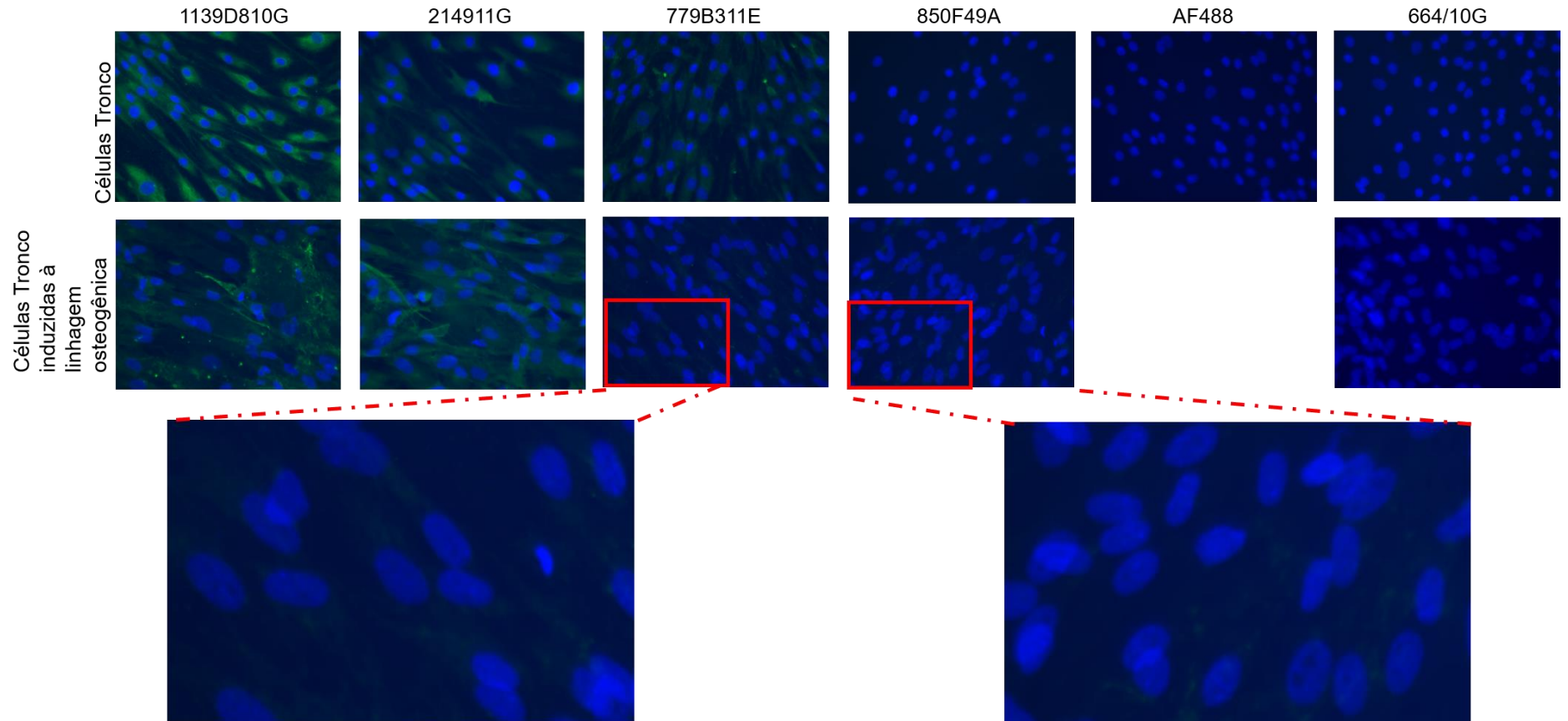


Figura 4.5 – Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-osteopontina em células tronco não induzidas e células tronco induzidas à diferenciação osteogênica. Os AcMs foram usados nas seguintes diluições em PBS: 1139D810G – 1:50; 214911G – Puro; 779B311E - 1:100; 850F49A – 1:800; AF488 – 1:200 e 664/10G 1:100. Como controles de marcação foram utilizados um anticorpo monoclonal anti-nucleoproteína de hantavírus 664/10G (MAZZAROTTO *et al.*, 2009) de mesmo isótipo (IgM $_{\kappa}$) e marcação utilizando apenas o anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (AF488). As marcações menos intensas estão representadas na parte inferior da figura. As fotos foram tiradas com aumento de 400x. Autoria própria, 2021.

Procurando avaliar a reatividade dos AcMs frente à proteína OPN recombinante utilizada na sua produção foi realizado um ensaio de *Western Blot*. A presença da OPN recombinante na membrana de nitrocelulose após a transferência foi confirmada corando a membrana com uma solução Ponceau (Figura 4.6A). Os resultados da imunomarcação ilustrados na Figura 4.6B mostram que apenas o AcM 779B311E e o anticorpo comercial reconheceram a OPN recombinante por essa metodologia.

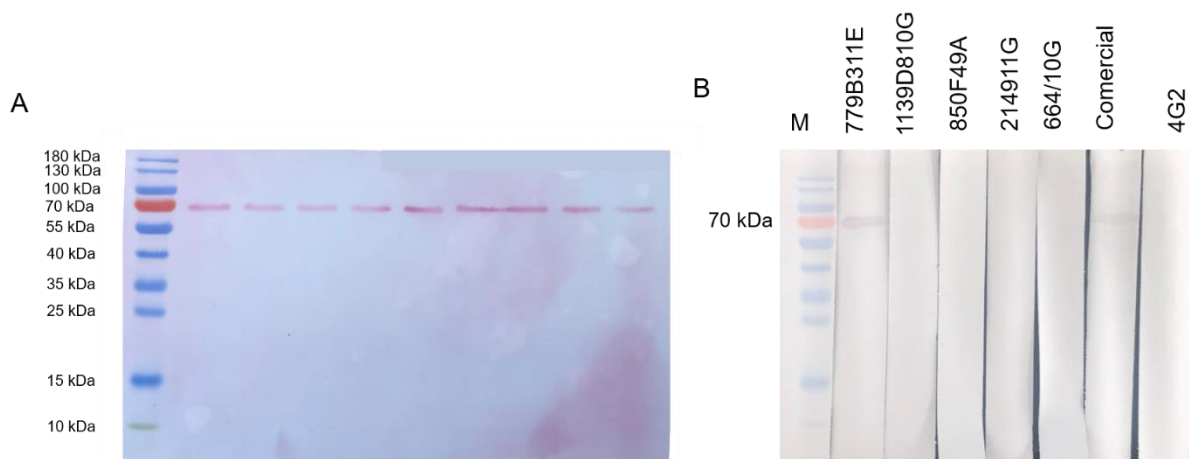


Figura 4.6 – Perfil de reação dos AcMs frente à OPN recombinante por *Western Blot*. Os AcMs foram usados nas seguintes diluições em TBS 5% leite: 664/10G 1:50; 214911G – Puro; 850F49A – 1:800; 779B311E - 1:100; 1139D810G – 1:50. A) Membrana de nitrocelulose corada com solução Ponceau após transferência da proteína OPN recombinante do gel para membrana. B) Membrana de nitrocelulose após imunomarcação. A banda vermelha representa a altura esperada da OPN recombinante ~70 kDa. M – Marcador pré-corado PageRuler. Autoria própria, 2021.

4.1.1 Análises *in silico*

A fim de verificar a especificidade dos AcMs gerados optou-se por testar seu perfil de reação frente a células de inseto da linhagem C6/36, originada do mosquito *Aedes albopictus*.

Na base de dados do GenBank podem ser encontradas duas proteínas anotadas no genoma de *Aedes albopictus* com o nome osteopontina (Gene IDs: 109402710 e 115259443), porém nenhuma das duas possui homologia com a proteína humana. Buscas, utilizando a ferramenta tBLASTn, baseadas na sequência proteica da proteoforma a ou variante 1 da OPN também não encontraram nenhuma sequência similar em mosquitos do gênero *Aedes*. Mesmo usando parâmetros menos rigorosos de busca nenhuma proteína com similaridade significativa foi encontrada na base de dados em sequências taxonomicamente identificadas como *Aedes spp*. Estes dados indicam que esta linhagem celular seria, portanto, um bom controle para verificarmos a especificidade dos AcMs.

No entanto, conforme pode ser constatado pelos resultados apresentados nas Figuras 4.7 e 4.8, os AcMs apresentaram reatividade com as células C6/36 tanto pela metodologia de IFI (Figura 4.7) quanto por citometria de fluxo (Figura 4.8). Esta reatividade também foi verificada para o anticorpo monoclonal comercial (Figura 4.8). Os AcMs também apresentaram reatividade com linhagem celular AP61, originada de *Aedes pseudocutellaris* (dados não mostrados).

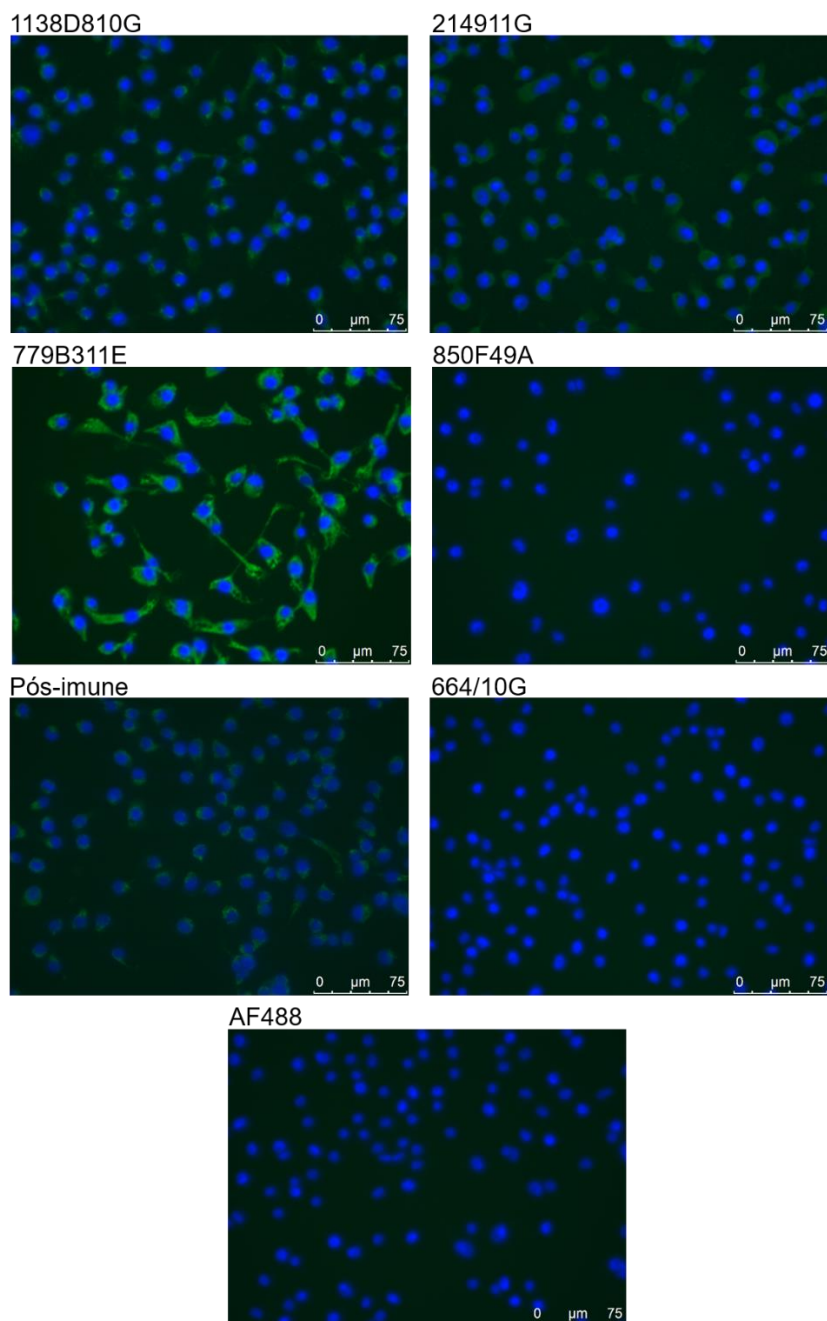


Figura 4.7 – Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-OPN na linhagem C6/36 por IFI. O soro pós-imune foi obtido durante o protocolo de produção dos AcM. Os AcMs foram usados nas seguintes diluições em PBS: 1139D810G – 1:50; 214911G – Puro; 779B311E - 1:100; 850F49A – 1:800; AF488 – 1:200; soro pós-imune – 1:400 e 664/10G 1:100. Como controles de marcação foram utilizados um anticorpo monoclonal anti-nucleoproteína de hantavírus 664/10G, (MAZZAROTTO *et al.*, 2009) de mesmo isótipo (IgM_κ) e marcação utilizando apenas o anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (AF488). As fotos foram tiradas com aumento de 400x. Autoria própria, 2021.

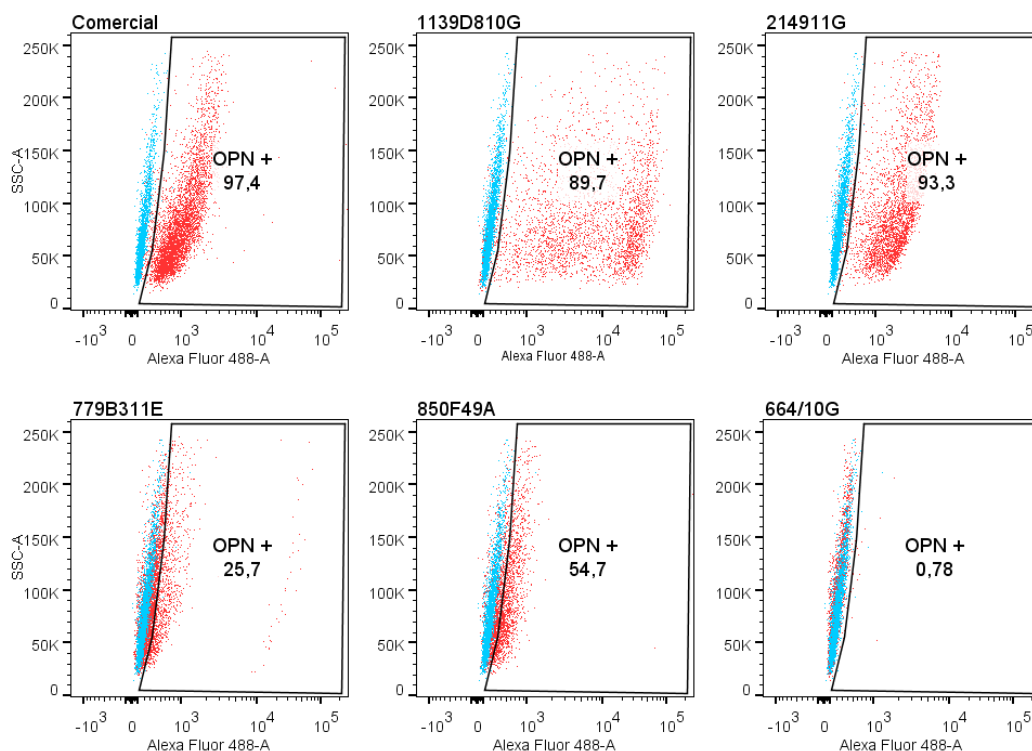


Figura 4.8 – Reatividade dos anticorpos anti-OPN na linhagem C6/36 por citometria de fluxo. Como controles de marcação foram utilizados o anticorpo monoclonal comercial (7C5H12), um anticorpo monoclonal anti-nucleoproteína de hantavírus 664/10G (MAZZAROTTO *et al.*, 2009) de mesmo isótipo (IgM_k) e marcação utilizando apenas o anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (AF488). Os AcMs foram usados nas seguintes diluições em Perm/Wash Buffer 1x: Comercial – 1:200; 1139D810G – 1:50; 214911G – Puro; 779B311E - 1:100; 850F49A – 1:800; AF488 – 1:400 e 664/10G 1:100. Imagens representativas de um experimento independente realizado em duplicata. Autoria própria, 2021.

Tendo em vista este resultado inesperado, buscamos verificar se seria possível identificar possíveis epítomos compartilhados entre a OPN humana e proteínas de *Aedes spp.* que poderiam justificar estes resultados. Para isso, foi realizada a predição de epítomos lineares de células B da OPN humana usando ferramentas *in silico* disponíveis na *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (<https://www.iedb.org>). Foram preditos 1573 epítomos com base nos modelos disponíveis. Aqueles que possuíam tamanho de sete resíduos de aminoácidos e apareciam em quatro ou mais modelos foram considerados, dessa forma 307 epítomos preditos foram selecionados (Tabela 4.2). Após a busca com a ferramenta BLASTp, foi verificado que 13 desses epítomos (Figura 4.9): ADSGSSE, AQDLNAP, DDEDDDD, DMDEDD, DSASSEV, IAVICFC, LRSKSKK, LSKVSRE, MDDEDDD, PDATDED, SHHSDES, SSEEKQL, VAQDLNA, apresentam sequências idênticas a sequências encontradas em proteína de mosquitos pertencentes às espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (APÊNDICE C). Este resultado indica que a reatividade observada em células C6/36 pode ser decorrente da presença de epítomos

compartilhados entre a OPN humana e proteínas encontradas em insetos do gênero *Aedes*.

Tabela 4.2 – Epítomos preditos por 4 ou mais modelos para os AcMs anti-OPN.

Epítomos preditos em 4 modelos								Epítomos preditos em 5 modelos
ADSGSSE	DKHLKFR	ESHHSDE	IDSQELS	LVVDPKS	QNLAPQ	SQDSIDS	VVPTVDT	DELVTDF
AETHSHK	DLNAPSD	ESNEHSD	IPVAQDL	LYKRKAN	QSAETHS	SQELSKV	VVYGLRS	DMLVVDP
AIPVAQD	DLPATEV	ETHSHKQ	IPVKQAD	LYNKYPD	QSDSHH	SQKQNL	VYGLRSK	EETNDFK
AIPVKQA	DMDEDD	ETLPSKS	IQYPDAT	MDEDD	QSRLYKR	SQLDDQS	WDSRGKD	PDAVATW
ANDESNE	DPKSKEE	ETNDFKQ	ISHELDS	MDDMDDE	QYPDATD	SREFHSH	WLNPDP	PKSKEED
APQNAVS	DPSQKQN	ETSQLDD	ITCAIPV	MESEELN	REFHSHE	SRGKDSY	YDGRGDS	SDVIDSQ
APSDWDS	DQSAETH	EVFTPVV	ITSHMES	MLVDDPK	RGDSVVY	SRLYKRK	YETSQD	SKSKKFR
AQDLNAP	DSASSEV	FCLLGIT	KAIPVAQ	MRIAVIC	RGKDSYE	SSEKQL	YGLRSKS	
ATDEDIT	DSDDVDD	FHSHEM	KANDES	NAPSDWD	RIAVICF	SSEETND	YKAIPVA	
ATEVFTP	DSGSSEE	FHSHEFH	KDSYETS	NAVSSEE	RISHELD	SVVYGLR	YKRKAND	
ATWLNP	DSHQSD	FKQETLP	KEEDKHL	NDESNEH	RKANDES	SYETSQ	YNKYPDA	
AVATWLN	DSIDSND	FPTDLPA	KFRISHE	NDFKQET	RLYKRKA	TCAIPVK	YPDATDE	
AVICFCL	DSNDSDD	FRISHEL	KFRRPDI	NDSDDVD	RPDIQYP	TDDSHQS	YPDAVAT	
AVSSEET	DSQDSID	FRRPDIQ	KHLKFRI	NEHSDVI	RRPDIQY	TDEDITS		
AYKAIPV	DSQELSK	FTPVVPT	KKFRRPD	NESHDM	RSKSKKF	TDFPTDL		
CAIPVKQ	DSRGKDS	GAYKAIP	KQADSGS	NGAYKAI	SAETHSH	TDLPATE		
CFCLLGI	DSVVYGL	GDSVVYG	KQETLPS	NKYPDAV	SDDVDDT	TEVFTP		
CLLGITC	DSYETSQ	GITCAIP	KQLYNKY	NLLAPQN	SDELVTD	THSHKQS		
DATDEDI	DTDDSHQ	GKDSYET	KQNLAP	NPDPSQK	SDESDEL	TLPSKSN		
DAVATWL	DTYDGRG	GLRSKSK	KQSRLYK	PATEVFT	SDESHHS	TNDFKQE		
DDDDHVD	DVDDTDD	GRGDSVV	KRKANDE	PDATDED	SDWDSRG	TPVVPTV		
DDDHVDS	DVIDSQE	GSSEKQ	KSKEEDK	PDIQYPD	SEEKQLY	TSHMESE		
DDEDDDD	DWDSRGK	HDHMDDM	KSKKFRR	PDPSQKQ	SEELNGA	TSQLDDQ		
DDHVDSQ	EDDDDHV	HEDMLVV	KSNESH	PQNAVSS	SEETNDF	TVDTYDG		
DDMDDED	EDITSHM	HEFHSHE	KVSREFH	PSDWDSR	SGSSEEK	TWLNPD		
DDQSAET	EDKHLKF	HELDSAS	KYPDAVA	PSKSNES	SHDHMD	TYDGRGD		
DDSHQSD	EDMLVVD	HHSDESD	LAPQNAV	PSQKQNL	SHEDMLV	VAQDLNA		
DDTDDSH	EEDKHLK	HKQSRLY	LDDQSAE	PTDLPAT	SHEFHS	VATWLN		
DDVDDTD	EKQLYN	HLKFRIS	LDSASSE	PTVDTYD	SHELDSA	VDDTDDS		
DEDDDDH	EELNGAY	HMDDMD	LGITCAI	PVAQDLN	SHHSDES	VDPKSKE		
DEDITSH	EFHSHED	HMESEEL	LKFRISH	PVKQADS	SHKQSRL	VDSQDSI		
DESDELV	EFHSHEF	HQSDESH	LLAPQNA	PVVPTVD	SHMESEE	VDTYDGR		
DESHHS	EHSVID	HSDSDE	LLGITCA	QADSGSS	SHQSDES	VFTPVP		
DESNEHS	EKQLYNK	HSDVIDS	LNAPSDW	QDLNAPS	SIDSNS	VICFCLL		
DFKQETL	ELDSASS	HSHEMML	LNGAYKA	QDSIDSN	SKEEDKH	VIDSQEL		
DFPTDLP	ELNGAYK	HSHEFHS	LNPDP	QELSKVS	SKKFRRP	VKQADSG		
DGRGDSV	ELSKVSR	HSHKQSR	LPATEVF	QETLPSK	SKSNESH	VPTVDTY		
DHMDDMD	ELVTDFP	HVDSQDS	LPSKSNE	QKQNLLA	SKVSREF	VSREFHS		
DHVDSQD	EDELVT	IAVICFC	LRKSKK	QLDDQSA	SNDSDDV	VSSEETN		
DIQYPDA	ESEELNG	ICFCLL	LSKVSRE	QLYNKYP	SNEHSDV	VTDFTD		
DITSHME	ESHDM	IDSNSD	LVTDFPT	QNAVSS	SNESH	VVDPKSK		

Em vermelho: destacado o epítomo analisado nos estudos de Sharif S. (2008). Autoria própria, 2021.

NH₃⁺ – MR IAVICFCLLGITCAIPVKQADSGSSEEKQLLYNKYPDA
 VATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSEETNDKQETLPSKSN
 ESHDHMDDDDEDDDDHVDSQDSIDSNDSDDVDDTDDSH
 QSDE SHHSDDELVTDFTPDLPADEVFTPVVPTVDTYD
 GRGDSVVYGLRSKSKKFRRPDIQY PDATDEDITSHMESE
 ELNGAYKAI PVAODLNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSA
 ETHSHKQSRLYKRKANDESNEHSDVIDSQE LSKVSREFH
 SHEFHSHEDMLVVDPKSKEEDKHLKFRISHELD SASSEV
 NV –COO⁻

■ Domínio rico em aspartato ■ Fosforilação
▼ Sítio de clivagem por trombina ▼ Sítio de clivagem por MMP-3/MMP-7

Figura 4.9 – Epítomos preditos *in silico* para OPN. Na sequência referente a OPN a ou variante 1 (ID: NP_001035147.1) estão sublinhados em vermelho ou preto os epítomos preditos *in silico* que correspondem a sequências encontradas em proteínas de mosquitos do gênero *Aedes*. Autoria própria, 2021.

4.2 GERAÇÃO DE LINHAGEM A549 DEFICIENTE EM OPN UTILIZANDO CRISPR-CAS9

4.2.1 Transfecção do RNP

Para uso da tecnologia CRISPR-Cas9 são necessários sgRNAs que como o próprio nome indica, direcionam a proteína Cas9 ao gene de interesse. Para síntese *in vitro* do sgRNA, primeiramente realizamos a síntese do molde de DNA conforme descrito na metodologia. Obtivemos as amplificações referentes a todos os guias e os produtos de PCR foram purificados e dosados. As seguintes concentrações foram obtidas: para o éxon 2 – 4,3 ng/μL, éxon 6 – 10,6 ng/μL e éxon 7 – 10,2 ng/μL (Figura 4.10A). Os produtos de PCR foram transcritos em RNA, purificados e dosados, 2 - 1,116 μg/μL, 6 – 3,803 μg/μL e 7 – 4,403 μg/μL (Figura 4.10B).

Para obter a sequência dos DNAs doadores foi realizada a amplificação a partir do DNA extraído das células A549, entretanto a concentração desejada do produto de PCR não foi obtida. A quantidade indicada na metodologia de Medeiros *et al.* (2017) é de 20 a 40 μg do DNA doador. Com o intuito de aumentar a quantidade final do DNA doador, o mesmo foi clonado no vetor pUC18-TA (Figura 4.10C) que serviu como molde para novas reações. As amplificações dos DNAs doadores a partir do vetor foram realizadas com sucesso, os produtos de PCR purificados foram dosados e as seguintes concentrações foram obtidas: 2- 148,5 ng/μL, 6- 254,3 ng/μL e 7- 198,7 ng/μL (Figura 4.10D). Apesar das mesmas ainda não corresponderem ao indicado na

metodologia base para realizar a transfecção, o número de moléculas presentes em 1 μL ($2-4,18 \times 10^{11}$, $6-7,16 \times 10^{11}$ e $7-5,6 \times 10^{11}$) já proporciona que a quantidade do DNA doador esteja em excesso de pelo menos 10^5 vezes em relação a quantidade de células transfectadas (1×10^6). Consideramos então que esta quantidade já deveria ser suficiente para servir de substrato para HDR promovendo a inativação do gene da OPN.

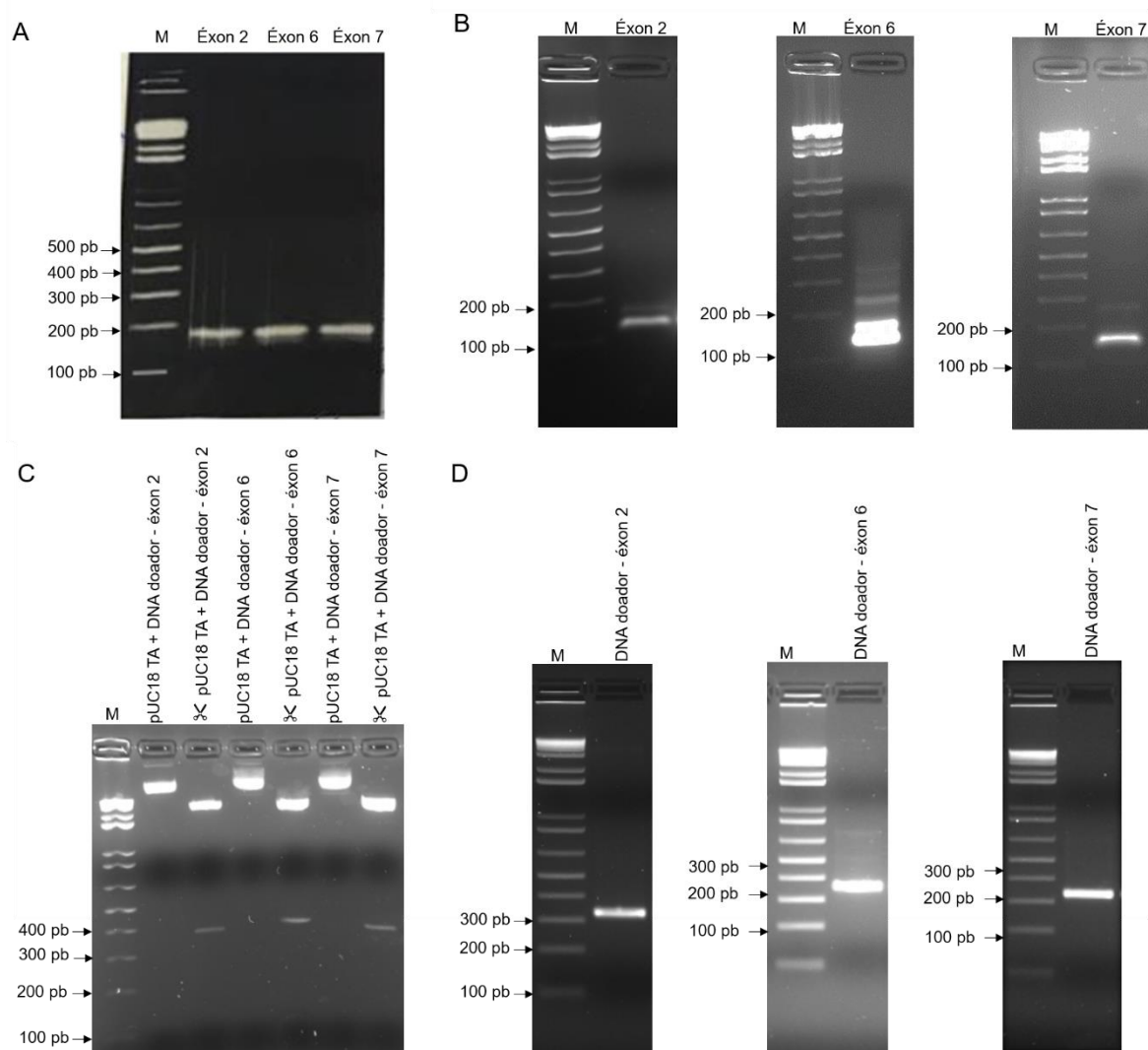


Figura 4.10 – Obtenção do sgRNA e DNA doador. A) Foram aplicados 2 μL das PCRs purificadas em gel 2% agarose contendo 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio, O tamanho esperado do produto é de 179 pb. M: marcador 1kb plus (Cat. No. 10787018, Invitrogen), éxons 2, 6 e 7: moldes de DNA para síntese por transcrição *in vitro* do sgRNA. B) Foram aplicados 1 μL dos transcritos com aproximadamente 154 nucleotídeos referentes aos sgRNAs que tem como alvo os éxons 2, 6 e 7. M: marcador 1kb plus. C) Digestão confirmatória dos clones dos DNAs doadores. Foram aplicados 1 μL dos vetores pUC18-TA ligados com o DNA doador ou todo volume da digestão dos mesmos com as enzimas KpnI e SphI (3 \times) em gel 2% agarose, contendo 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio. O tamanho esperado após a digestão é de aproximadamente 380 pb. M: marcador 1kb plus. D) Foram aplicados 1 μL das PCRs purificadas em gel 2% agarose, contendo 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio. O tamanho esperado do produto é de 329 pb. M: marcador 1kb plus. Autoria própria, 2021.

Com o objetivo de inativar o alvo, ou seja, a OPN, realizamos a transfecção dos RNPs e DNAs doadores correspondentes a cada éxon alvo nas células A549. Após

recuperação e expansão das culturas transfectadas as células foram plaqueadas em baixa densidade (0,5 a 0,7 células/poço) em placas de 96 poços. Os poços que apresentavam apenas uma ou duas células foram selecionados. Obedeceram a esse quesito sete poços de células transfectadas com as RNPs que tem como alvo o éxon 2 da osteopontina, vinte poços de células transfectadas com as RNPs que tem como alvo o éxon 6 e 61 poços de células transfectadas com as RNPs que tem como alvo o éxon 7.

Depois que as células dos poços selecionados proliferavam, formando uma colônia celular, uma IFI, semelhante àquela executada para caracterização dos AcMs, era realizada nas mesmas para verificar o sucesso da estratégia. As culturas celulares que apresentavam indício de reação negativa eram selecionadas. Dessa forma selecionamos cinco culturas transfectadas com as RNPs que tem como alvo o éxon 6 e seis culturas transfectadas com as RNPs que tem como alvo o éxon 7. As culturas transfectadas com as RNPs que tem como alvo o éxon 2 da osteopontina apresentaram contaminação com micoplasma e desse modo foram descartadas.

Tendo em vista que após esta primeira etapa de seleção as culturas ainda apresentavam uma mistura de células reativas e não reativas, as culturas selecionadas nesta etapa que apresentaram resultado mais promissor foram novamente plaqueadas em baixa densidade (0,5 a 0,7 células/poço). Para isso foram escolhidas duas culturas transfectadas com as RNPs que tem como alvo o éxon 6 e uma cultura transfectada com as RNPs que tem como alvo o éxon 7. A partir dessas culturas uma sucessão de novas IFIs e plaqueamentos em baixa densidade foram efetuados (vide Figura 4.11), objetivando a obtenção de culturas celulares clonais deficientes na expressão da OPN.

Duas culturas celulares transfectadas com as RNPs que tem como alvo o éxon 7 apresentaram reação positiva contra os AcMs com agrupamentos celulares negativos e foram consideradas as mais promissoras para deficiência em OPN. Em ambas as culturas a maioria das células apresentou reação negativa contra o AcM 1139D810G, entretanto a cultura celular ainda apresentava regiões com reação positiva contra o AcM 779B311E (Figura 4.12A e B).

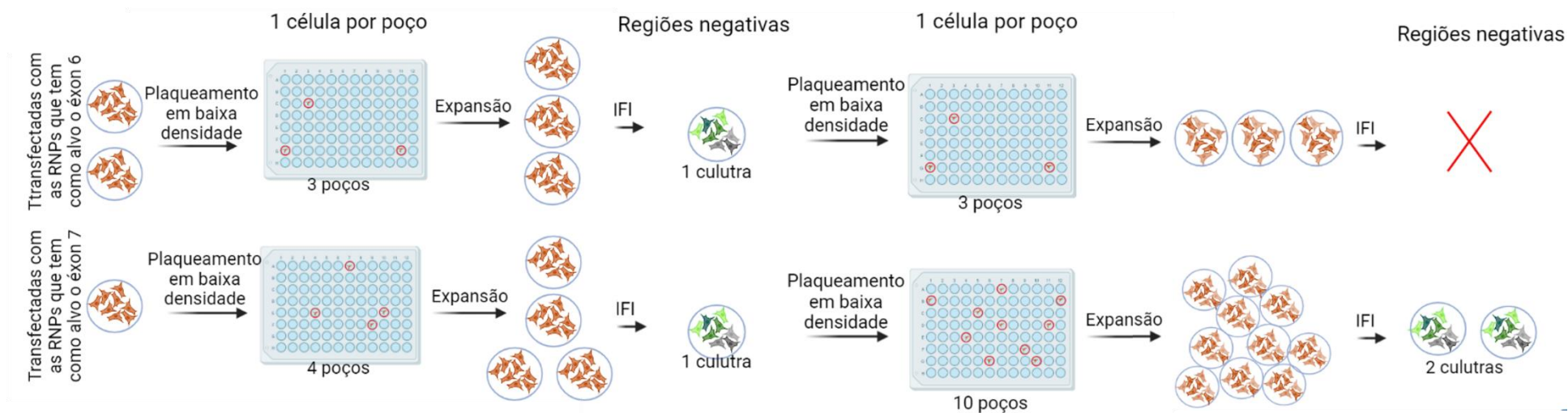


Figura 4.11 – Esquema dos passos para obtenção de culturas deficientes na expressão de OPN. As culturas selecionadas foram submetidas a plaqueamento em baixa densidade. Poços apresentando uma célula por poço (destacados por contorno em vermelho) foram expandidos e as culturas testada por IFI. Aquelas culturas que apresentavam agrupamentos celulares negativos eram selecionadas para nova etapa de plaqueamento em baixa densidade visando a obtenção de uma cultura clonal deficiente na expressão de OPN. Criado com BioRender.com. Autoria própria, 2021.

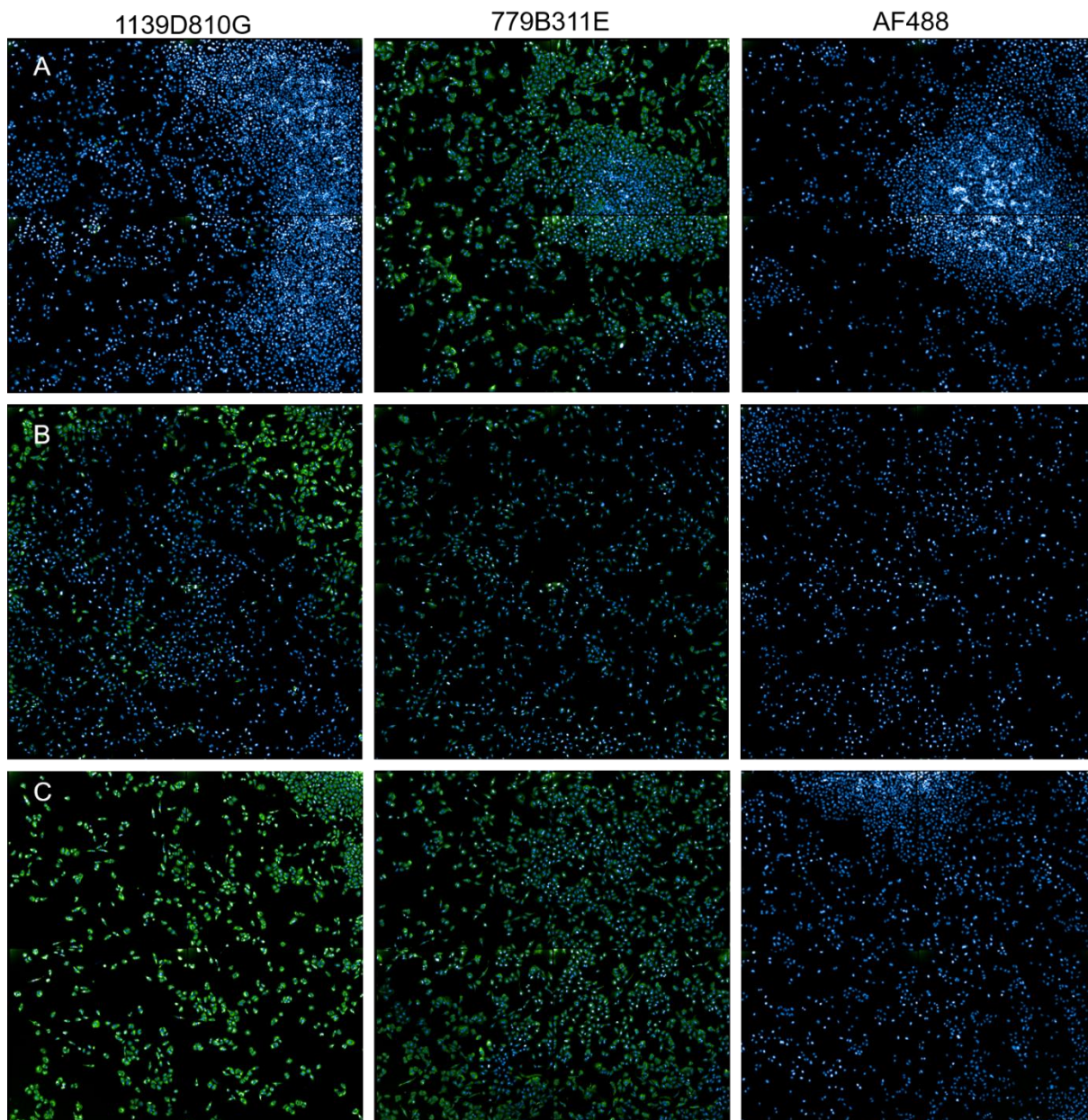


Figura 4.12 – Perfil de reação dos AcMs 1139D810G e 779B311E na cultura celular transfectada com RNPs que possuem como alvo o éxon 7. Os AcMs foram usados nas seguintes diluições em PBS: 1139D810G – 1:200; 779B311E - 1:100; e AF488 – 1:400. A e B representam as culturas celulares selecionadas, pois possuem agrupamentos celulares com reação negativa contra o AcM 1139D810G, enquanto C representa a cultura celular com reação positiva aos AcMs testados. Como controle foi efetuada a marcação utilizando apenas o anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (AF488). Quatro campos de cada poço foram analisados em aumento de 20x. As imagens foram obtidas utilizando o equipamento Operetta CLS. Autoria própria, 2021.

As células originadas da segunda etapa de seleção por plaqueamento em baixa densidade foram também testadas usando uma PCR *semi-nested*. As células transfectadas com as RNPs que tem como alvo o éxon 6 apresentaram amplificação somente utilizando *primers* para a sequência de OPN não editada. Já as células transfectadas com as RNPs que tem como alvo o éxon 7 apresentaram amplificação tanto com os *primers* que amplificam a sequência de OPN não editada quanto com os

primers que amplificam a sequência de OPN contendo o DNA doador inserido por HDR (Figura 4.13). Assim é possível que esteja ocorrendo a inativação parcial do éxon 7 da OPN nas células A549 e por isso ainda é provável que a proteína esteja sendo expressa.

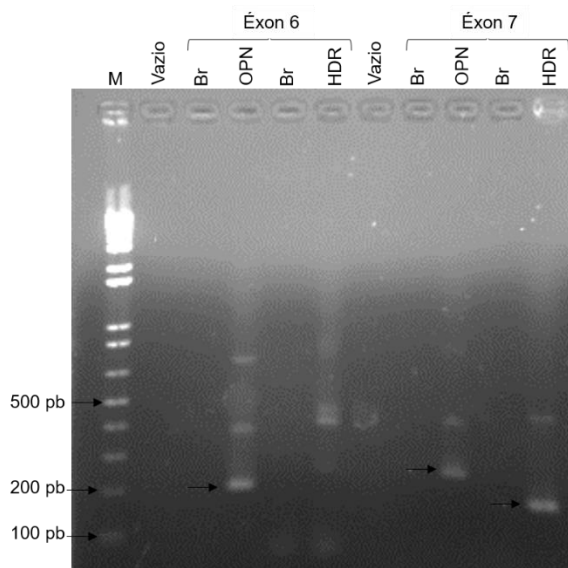


Figura 4.13 – PCR para avaliação das células deficientes em OPN. Produtos de PCR aplicados em gel de agarose 2%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídio. A amplificação do DNA extraído de células A549 transfectadas com as RNPs tendo como alvo o éxon 6 apresentou banda para sequência de OPN intacta (OPN), aproximadamente 197 pb, e não apresentou banda do tamanho desejado para a sequência de OPN contendo DNA doador inserido por HDR (HDR) (tamanho esperado de 197 pb). Nas células A549 transfectadas com as RNPs tendo como alvo o éxon 7 pode ser observada uma banda em aproximadamente 239 pb correspondendo a amplificação da sequência de OPN intacta, assim como uma banda de aproximadamente 177 pb correspondendo a amplificação do gene contendo o DNA doador inserido por HDR. Br: controles negativos, sem o material genético. M: marcador 1kb plus. Autoria própria, 2021.

4.2.2 Transfecção com plasmídeo (PX459)

Três guias foram selecionados, a partir do resultado da plataforma GPP sgRNA Designer e do CRISPR gRNA Design tool. Dois tem como alvo o éxon 6 (ATCAGAGTCGTTTCGAGTCAA – guia 1; ATAGTGTGGTTTATGGACT – guia 2) e um o éxon 7 (CACCTCACACATGGAAAGCG – guia 3) (Figura 4.14). As sequências correspondentes foram clonadas no vetor PX459 e após análise do sequenciamento verificou-se que apenas o guia 1 e o guia 3 foram corretamente inseridos no vetor (Figura 4.15).

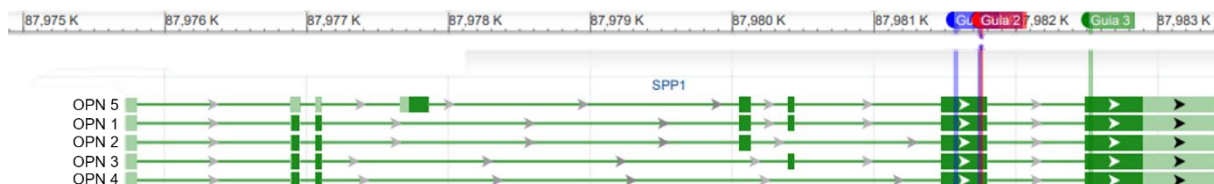


Figura 4.14 – Guias selecionados para segunda estratégia. Os três guias escolhidos têm como alvo os éxons 6 (Guia 1 – azul e Guia 2 – vermelho) e 7 (Guia 3 – verde), os quais são compartilhados pelos cinco transcritos codificadores de OPN. Os íntrons estão representados por linhas, as regiões não codificadoras em verde claro e os éxons codificadores em verde escuro. Imagem criada com Genome Data Viewer (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=6696>). Autoria própria, 2021.

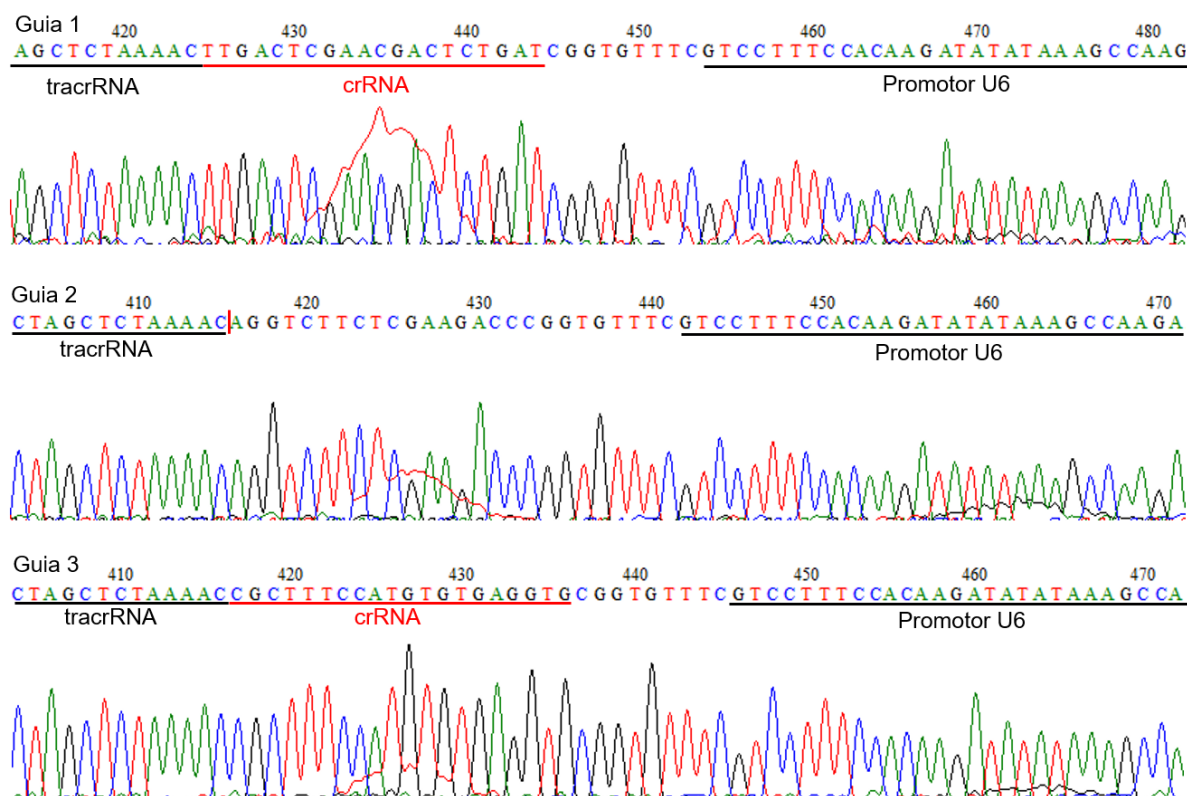


Figura 4.15 – Resultado do sequenciamento. O eletroferograma indica a inserção correta dos guias 1 e 3 no vetor PX459 destacados em vermelho. Sublinhados em preto estão indicadas as sequências correspondentes ao tracrRNA e ao promotor U6, presentes no vetor. Criado com auxílio do BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5. Autoria própria, 2021.

Em busca de uma cultura celular deficiente em OPN foi efetuada a transfecção dos plasmídeos individualmente ou em conjunto (que continham a sequência do guia 2 e do guia 3) nas células A549 e a seleção com puomicina das mesmas. É importante salientar que a transfecção foi realizada antes da análise do sequenciamento dos vetores, desse modo todos os plasmídeos foram transfectados. Com exceção das culturas celulares transfectadas com plasmídeos que continham a sequência do guia 1, as demais culturas sobreviveram a seleção com puomicina, indicando que o conteúdo do plasmídeo foi inserido nas células e essas estão expressando o gene de resistência ao antibiótico. Após expansão das culturas, o DNA

foi extraído, a região alvo amplificada e sequenciada. Conforme ilustrado na Figura 4.16, foi constatada edição na sequência alvo do guia 3.

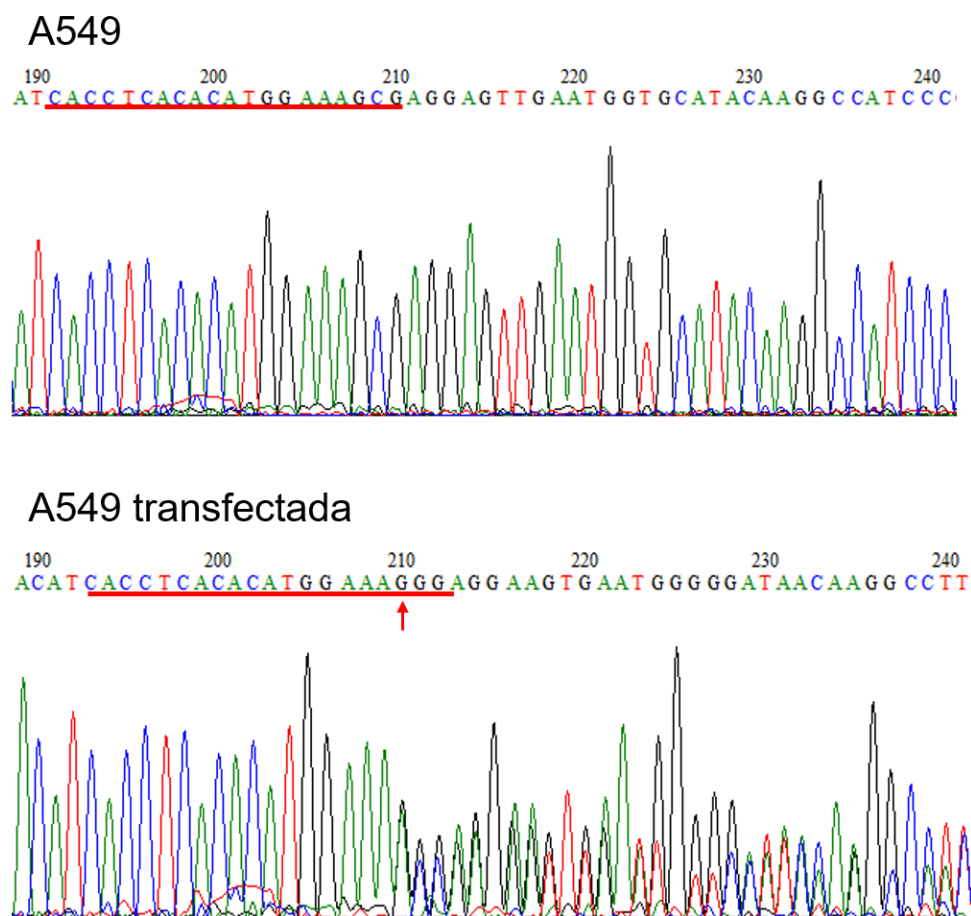


Figura 4.16 – Resultado do sequenciamento das células transfectadas com os plasmídeos contendo as sequências do guia 2 e do guia 3. No eletroferograma é possível observar a ocorrência de edição a partir do nucleotídeo indicado com a flecha vermelha pela presença de picos mistos a jusante. A sequência alvo do guia 3 está sublinhada em vermelho. Resultado semelhante foi observado para células transfectadas apenas com o plasmídeo contendo a sequência do guia 3. Criado com auxílio do BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5. Autoria própria, 2021.

Em seguida, o plaqueamento em baixa densidade das culturas transfectadas foi realizado e os poços que apresentavam apenas uma célula por poço foram selecionados. Foram obtidas doze culturas clonais a partir das células transfectadas com os plasmídeos que continham a sequência do guia 2 e do guia 3 em conjunto e dezesseis culturas clonais a partir das células transfectadas com o plasmídeo que continha a sequência do guia 3. As culturas transfectadas somente com plasmídeos que continham a sequência do guia 2 foram descartadas, de acordo com as análises de sequenciamento (Figura 4.15). Nenhuma das linhagens clonais geradas apresentou reação negativa contra os AcMs testados (1138D810G e 779B311E).

Análises de RT-qPCR foram realizadas em dez culturas clonais de forma a verificar se a expressão do mRNA de OPN estava alterada. Os resultados dessas análises preliminares indicam que as células transfectadas apresentam menor

expressão de mRNA da OPN quando comparadas às células A549 selvagens (Figura 4.17). Apesar de não termos conseguido sequenciar as linhagens clonais para confirmar as edições em cada uma delas, o resultado do sequenciamento anterior a obtenção dos clones indica que ocorreu edição nas culturas transfectadas e o resultado da expressão gênica demonstrou uma expressão diminuída. Conjuntamente, esses resultados sugerem que pode ter ocorrido algum grau de edição que resultou em decréscimo dos níveis de mRNA. Ainda não está claro, no entanto, se a discordância entre os resultados da IFI e RT-qPCR se deve a uma menor sensibilidade da IFI ou a inespecificidade dos AcMs.

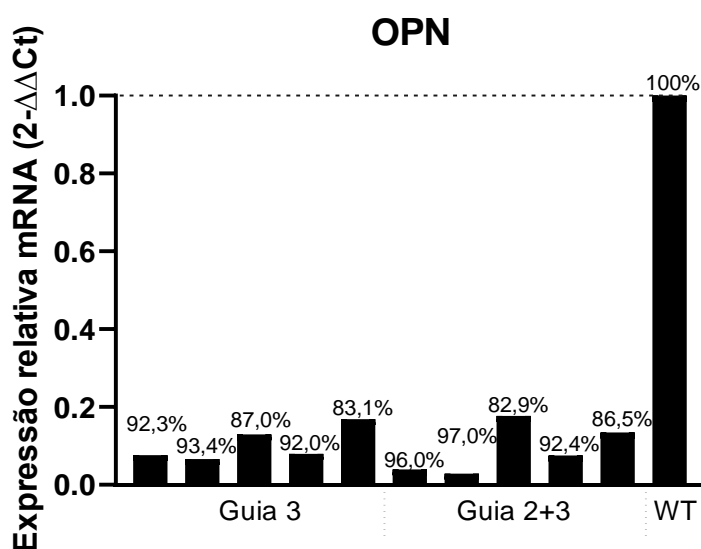


Figura 4.17 – Expressão relativa de mRNA de OPN nas células transfectadas. Dez culturas clonais transfectadas foram analisadas por RT-qPCR. Guia 3 - culturas transfectadas com plasmídeo que continha a sequência do guia 3. Guia 2+3 - culturas transfectadas com plasmídeos que continham as sequências dos guias 2 e 3. WT- mock 48h experimento Figura 4.23. As porcentagens indicadas sobre as barras correspondem as porcentagens de nocaute estimadas com base em Haines e Kelley (2018). Para normalização dos dados foi usado *HPRT* como gene de referência. Autoria própria, 2021.

4.3 MODULAÇÃO INDIRETA DA EXPRESSÃO DA OPN PELA MODULAÇÃO DA VIA HEDGEHOG

Uma vez que a OPN é um alvo transcricional da via Hedgehog, compostos que modulam esta via, como GDC-0449 e SAG, poderiam ser utilizados para avaliar o efeito da modulação da OPN durante a infecção pelo DENV. Os compostos foram selecionados com base no trabalho de Choi *et al.* (2014) no qual os autores mostram modulação da expressão gênica de OPN após tratamento de células Huh-7.5 com SAG e GDC-0449. Como neste estudo anterior os compostos foram testados em células Huh7.5, optou-se por realizar os testes tanto em células A549 quanto em Huh-7.5.

O primeiro passo foi avaliar a citotoxicidade dos compostos. Baseado nas concentrações usadas no trabalho de Choi *et al.* (2014), 0,3 μM para SAG e 5 μM para GDC-0449, optou-se por testar uma faixa que abrangesse concentrações abaixo e acima das previamente utilizadas. Com base nos resultados de MTT e vermelho neutro, só a maior concentração de ambas as drogas apresentou algum efeito citotóxico (Figura 4.18).

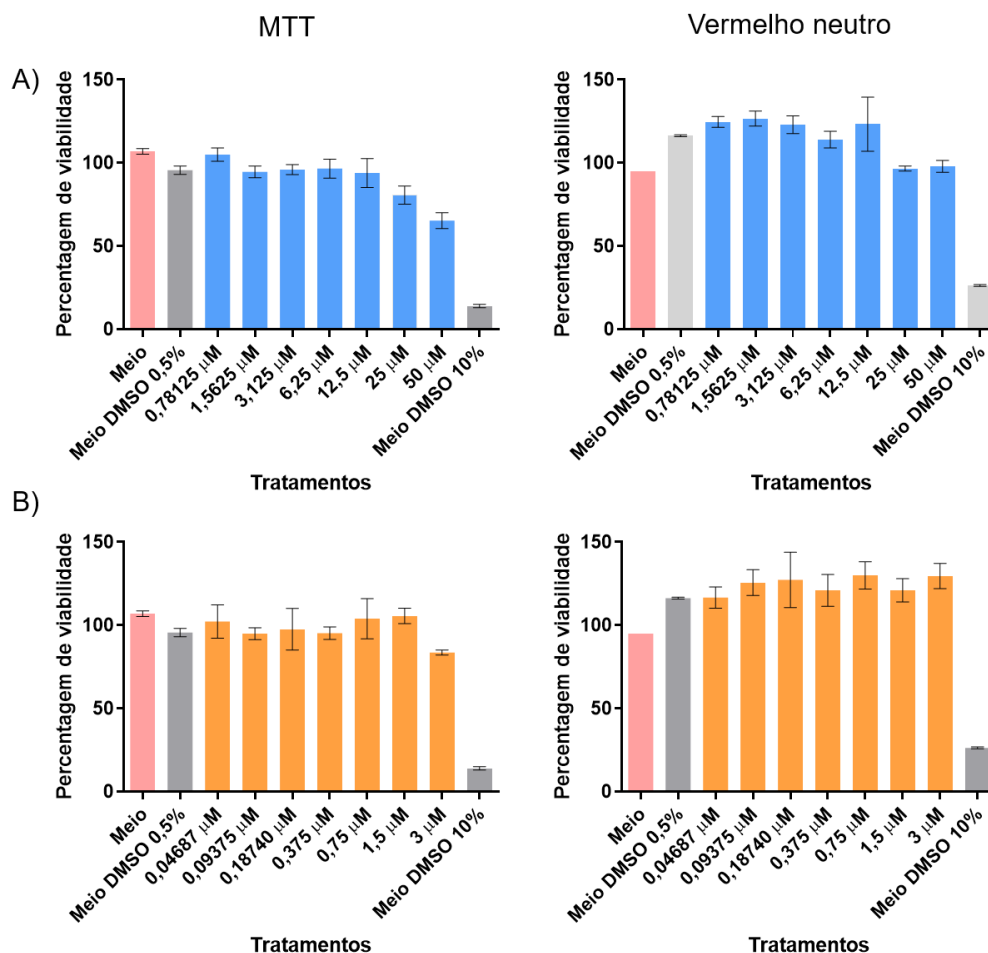


Figura 4.18 – Avaliação do efeito citotóxico dos compostos. A citotoxicidade foi avaliada por MTT e vermelho neutro. A) GDC-0499 (antagonista). B) SAG (agonista). As barras representam a média \pm desvio padrão de um experimento realizado em triplicata. Autoria própria, 2021.

A expressão da proteína em células tratadas com os compostos foi avaliada por IFI. Quando foi utilizado o soro pós-imune como anticorpo primário foi observada uma marcação bastante heterogênea. Por isso, o mesmo experimento foi repetido, usando o AcM 779B311E como marcação primária. Quando este anticorpo foi utilizado notamos que a média de intensidade de fluorescência (MFI) por poço não se alterava como o esperado. Ao aumentar a concentração de SAG (agonista) o esperado era que a MFI por poço aumentasse e ao aumentar a concentração de GDC-0449 (antagonista) o contrário deveria ocorrer com a MFI por poço. Observamos que independente das concentrações das drogas a MFI por poço não se alterava de forma

considerável em ambas linhagens celulares, A549 e Huh-7.5, e que na presença do antagonista GDC-0449 a MFI por poço foi maior que aquela com o agonista SAG (Figura 4.19) nas células da linhagem A549.

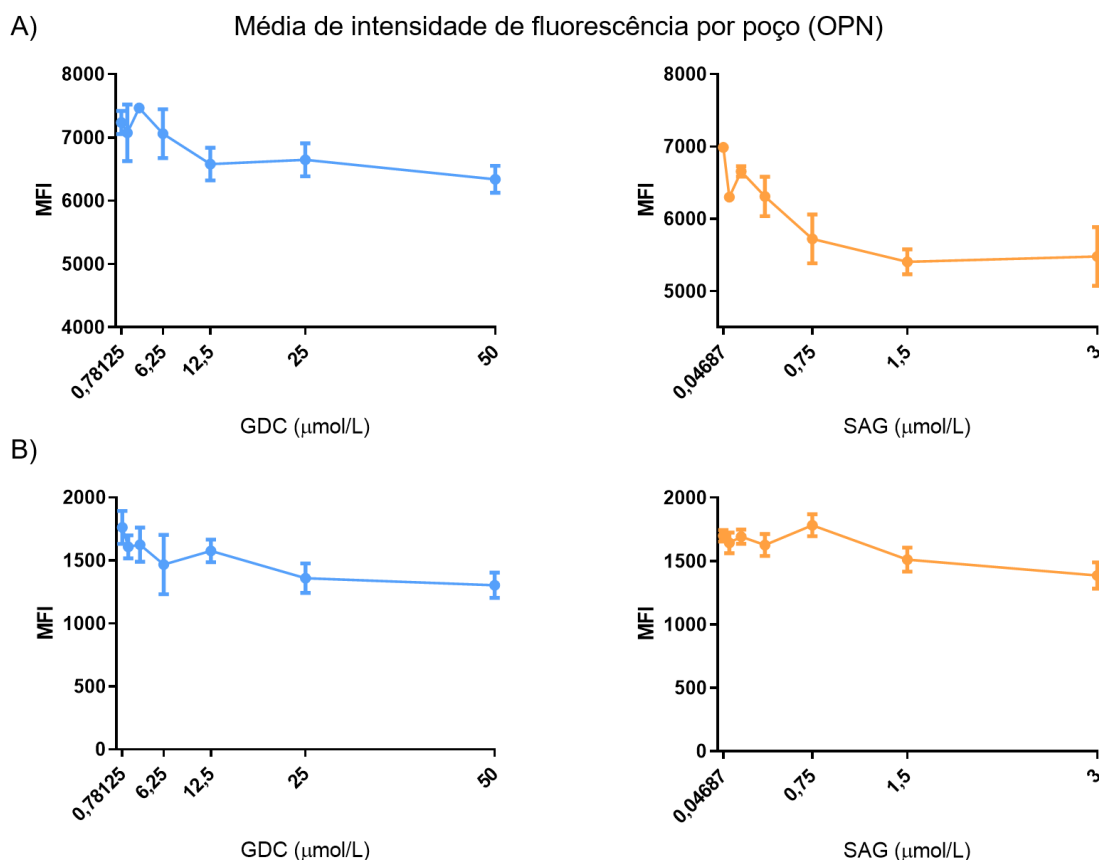


Figura 4.19 – Média de Intensidade de Fluorescência por poço de OPN em células tratadas com SAG e GDC-0449. Para estes experimentos as células foram marcadas utilizando uma diluição 1:100 do AcM 779B311E em PBS 1% BSA seguida da marcação utilizando anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 488. Estão representadas a médias \pm desvio padrão de um experimento realizado em triplicata A) A549 e B) Huh-7.5. Nove campos de cada poço foram analisados em aumento de 20x. As imagens foram obtidas utilizando o equipamento Operetta CLS e analisadas para extração do MFI usando o software Harmony 4.8. Autoria própria, 2021.

4.4 DINÂMICA DE MODULAÇÃO DA OSTEOPONTINA DURANTE A INFECÇÃO PELO DENV

4.4.1 Estoque viral

Para viabilizar a realização de experimentos *in vitro* visando avaliar a dinâmica de modulação da OPN durante a infecção pelo DENV o estoque viral foi preparado e quantificado. O estoque de DENV-4 (LRV13/422) foi titulado por foco (Figura 4.20A) nas células da linhagem C6/36, na qual apresentou título de $7,25 \times 10^6$ FFU/mL. A titulação por placa realizada na linhagem celular A549, (Figura 4.20B), apresentou o título 3×10^7 PFU/mL. Todos os experimentos usaram como base os títulos obtidos nas células A549.

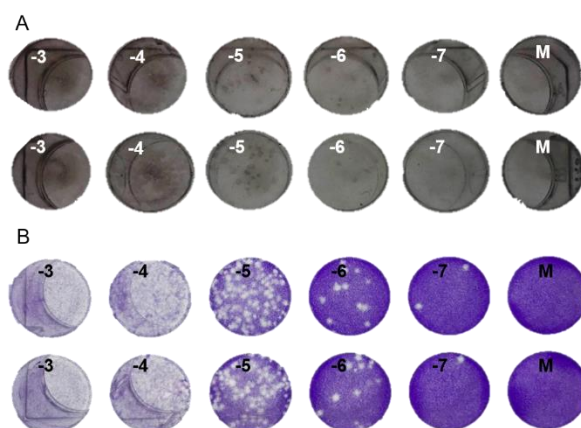


Figura 4.20 – Titulação do estoque viral. A) Titulação pela metodologia de foco em células C6/36. Para estes experimentos as células foram marcadas utilizando anticorpo anti-flavivirus 4G2 diluído 1:200 em PBS seguida da marcação utilizando anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina. B) Titulação pela metodologia de placa em células A549. Autoria própria, 2021.

4.4.2 Cinética de infecção em células A549

A fim de avaliar o efeito da infecção pelo DENV sobre a modulação da OPN, células A549 infectadas com DENV-4 foram analisadas após 6, 24 e 48 horas de infecção por citometria de fluxo. Conforme ilustrado na Figura 4.21 não foi observada modulação aparente da osteopontina nesse período.

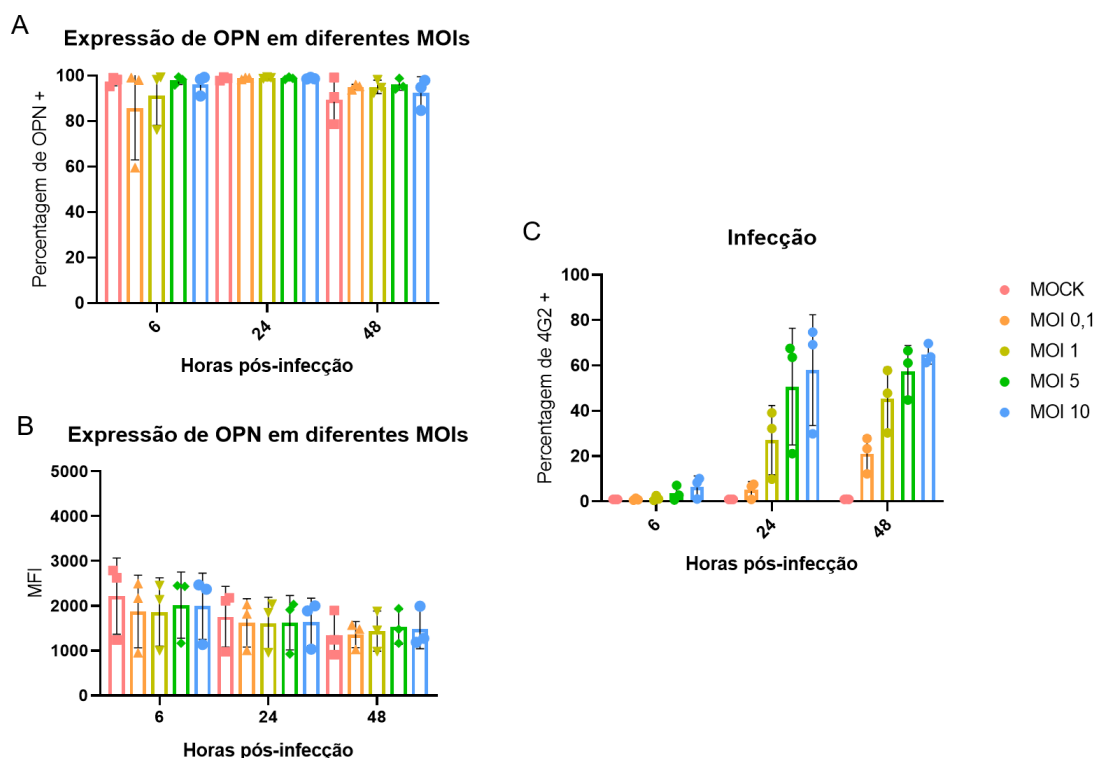


Figura 4.21 – Cinética de infecção em células A549. A) O gráfico representa a percentagem de células A549 expressando OPN em 6, 24 e 48 horas pós-infecção. Para estes experimentos as células foram marcadas utilizando uma diluição 1:200 do anticorpo monoclonal comercial (7C5H12) em PBS seguida da marcação utilizando anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 488. B) Média de intensidade de fluorescência. C) O gráfico representa a percentagem de células A549 infectadas com DENV-4 em 6, 24 e 48 horas pós-infecção. Como controle foi efetuada a marcação utilizando apenas o anticorpo secundário anti-IgG e IgM de camundongo conjugado com Alexa 488 (AF488). As barras indicam a média \pm desvio padrão. Dados coletados de três experimentos independentes. Autoria própria, 2021.

4.4.2.1 Quantificação dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR

Seguindo o protocolo de otimização das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores procurou-se selecionar condições nas quais não era observada a formação de *primer-dimer*. Estas concentrações, por sua vez foram utilizadas para testar a eficiência das reações. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.3. Foi observada a presença de *primer-dimer* nas amplificações de GAPDH, reveladas a partir das análises da curva de dissociação (Figura 4.22). Desse modo, o mesmo não foi utilizado como gene de referência nas análises subsequentes.

Tabela 4.3 – Concentração otimizada e eficiência de reação dos oligonucleotídeos iniciadores selecionados para RT-qPCR.

Oligonucleotídeos iniciadores	Quantidade (nM)	Eficiência da reação
FMHPRTF	250	99%
FMHPRTR	250	
GAPDHF	62,5	98%
GAPDHR	250	
OPNF	62,5	98%
OPNR	125	

Autoria própria, 2021.

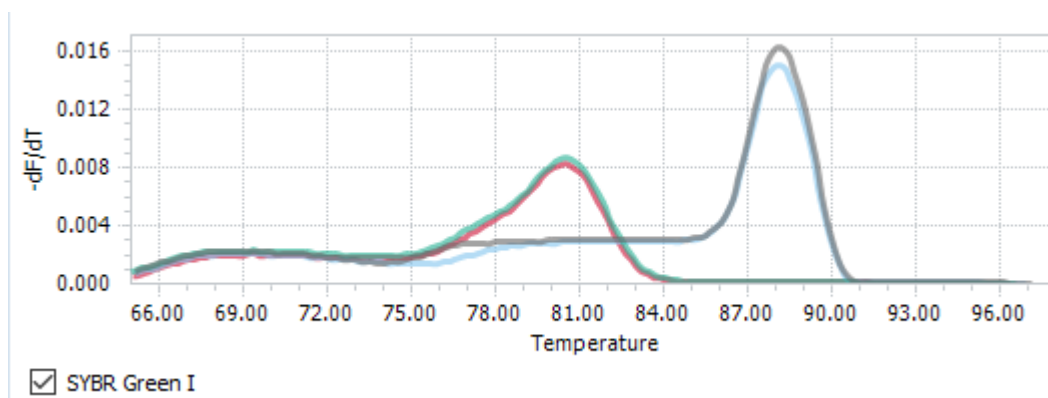


Figura 4.22 – *Primer-dimer* entre os oligonucleotídeos iniciadores de GAPDH. Os oligonucleotídeos iniciadores de GAPDH demonstram sequências de DNA fita dupla na ausência de molde de RNA para a amplificação em aproximadamente 80 °C. O produto esperado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para GAPDH pode ser observado em aproximadamente 88 °C. Autoria própria, 2021.

Com o propósito de avaliar o efeito da infecção pelo DENV sobre a modulação da OPN a análise de expressão gênica foi efetuada nas células A549 infectadas com DENV-4, MOI 1 em 6, 24 e 48 horas pós-infecção. Essa análise também não demonstrou alterações nos níveis de mRNA da OPN quando comparada aos níveis

de expressão das células não infectadas (Figura 4.23), corroborando com o resultado anterior.

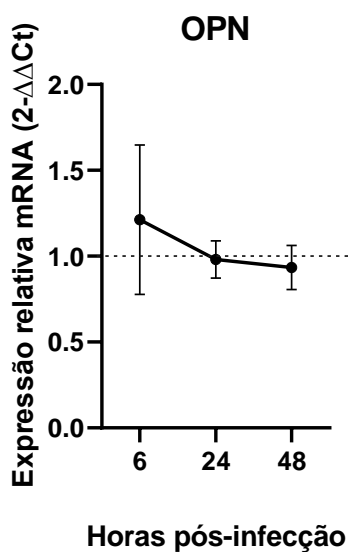


Figura 4.23 – Níveis de mRNA de OPN em células A549 infectadas com DENV-4. As células A549 foram infectadas com DENV-4, MOI 1 e analisadas em 6, 24 e 48 horas pós-infecção quanto ao nível de expressão de mRNA de OPN. Para normalização dos dados foi usado *HPRT* como gene de referência. As barras indicam a média \pm desvio padrão. Dados coletados de um experimento com duplicata técnica. Autoria própria, 2021.

5 DISCUSSÃO

A dengue é a arbovirose com mais casos prevalentes no mundo, são estimados que 3,9 bilhões de pessoas estão sob risco de infecção por dengue em 128 países (BRADY *et al.*, 2012). Apesar de já existir uma vacina licenciada para dengue (CYD-TDV), a mesma não é indicada para todos aqueles que estão em área de risco, pois está associada a um maior risco de dengue severa em indivíduos soro negativos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b). Algumas vacinas candidatas estão sendo estudadas e se encontram em fases diferentes de ensaios clínicos (DENG *et al.*, 2020), também estão sendo realizadas diversas pesquisas para reduzir o risco de dengue severa, entretanto ainda não foram desenvolvidos antivirais efetivos contra o DENV (LOW; OOI; VASUDEVAN, 2017). Por isso é tão importante estudar melhor o papel de fatores do hospedeiro envolvidos nas infecções virais (DENG *et al.*, 2020). Estes estudos, além de contribuírem para uma melhor compreensão de aspectos biológicos básicos da infecção também podem guiar a descoberta de tratamentos efetivos.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-OSTEOPONTINA

A OPN, com aproximadamente 32 kDa (KAZANECKI *et al.*, 2007b), possui diferentes proteoformas que são resultado tanto de *splicing* alternativo quanto de modificações pós-traducionais, tais como fosforilação de serina/treonina, glicosilação e sulfatação de resíduos de tirosina, permitindo a geração de proteoformas monoméricas distintas com massa molecular variando de 41 a 75 kDa (GIMBA; TILLI, 2013). Esta variação na massa molecular pode ser observada quando a OPN é analisada em gel SDS-PAGE, devido às modificações pós-traducionais já citadas e à alta e variável carga negativa resultante da quantidade de aminoácidos ácidos da proteína (KAZANECKI; UZWIAK; DENHARDT, 2007). Os AcMs anti-OPN apresentaram diferentes perfis de reação quando comparados entre si e em diferentes linhagens (Figura 4.4). Assim, os resultados obtidos poderiam indicar o reconhecimento de diferentes proteoformas da osteopontina. As proteoformas originadas de variantes de *splicing* somente são observadas em tecidos não saudáveis e as junções de *splicing* representam novos epítomos, no entanto, esses possuem baixa imunogenicidade predita. Por isso, é mais comum encontrar anticorpos que reconhecem a forma canônica ou epítomos compartilhados pelas

diferentes proteoformas (ALSARKHI; WEBER, 2018). Shen e Weber (2014) produziram um anticorpo que reconhece apenas a OPN-c, pois foi originado a partir da imunização utilizando o peptídeo ac-EEKQNAVC, correspondente a junção de *splicing* da proteoforma 3 da OPN. O mesmo ocorre para o anticorpo específico para proteoforma 2, bOPN-117 (SPDATEEDFT), descrito por Bissonnette *et al.* (2012). Uma vez que os anticorpos monoclonais utilizados em nosso estudo foram gerados a partir da imunização com antígeno recombinante produzido em bactéria baseado na proteoforma a ou variante 1 da OPN, epítomos correspondendo a estas junções de *splicing* alternativo não estão presentes no antígeno. Assim, se os AcMs estão reconhecendo diferentes proteoformas, não seria por meio de epítomos resultantes destas junções de *splicing*.

Nas células HeLa MZ e Huh-7.5 imunomarcadas com os AcMs 850F49A e 779B311E foram observados corpos mais intensos (Figura 4.4). Relatos da literatura indicam que estes podem representar a localização da OPN no complexo de Golgi (SHINOHARA *et al.*, 2008).

A reatividade dos AcMs testada pela metodologia de *Western Blot*, revelou que apenas o AcM 779B311E reconheceu a banda correspondente à proteína recombinante (Figura 4.6B). Como um gel desnaturante foi utilizado para as análises de *Western Blot*, se a interação da proteína com os demais AcMs estiver ocorrendo através de epítomos conformacionais isso explicaria a não reatividade dos demais AcMs testados. Embora, análises prévias demonstrem que a OPN é uma proteína não estruturada e bastante flexível em solução (FISHER *et al.*, 2001). Todos os anticorpos haviam sido previamente triados por metodologia de ELISA em placas sensibilizadas com a proteína recombinante e tiveram sua reatividade confirmada por IFI em células HeLa MZ. Assim, a discordância entre os resultados obtidos com as metodologias de ELISA e IFI com o *Western Blot* sugerem o reconhecimento de um epítopo conformacional pelos demais AcMs (850F49A, 1139D810G e 214911G).

Outra possibilidade é que alguns anticorpos podem ser sensíveis a modificações pós-traducionais (KAZANECKI *et al.*, 2007b). As modificações pós-traducionais podem ser diferentes dependendo da origem (célula) da OPN estudada (KAZANECKI *et al.*, 2007b), resultando em diferentes perfis de bandas em ensaios de *immunoblotting* (SILVA *et al.*, 2020). A proteína recombinante foi produzida em bactéria e por isso não apresenta as modificações pós-traducionais da OPN humana nativa, a qual é altamente glicosilada e fosforilada (BAUTISTA *et al.*, 1994). Ainda que as modificações possam ser responsáveis pela alteração de estruturas

proteicas de ordem superior é possível produzir anticorpos que reconhecem a OPN nativa através da imunização de camundongos com a proteína recombinante produzida em bactérias (BAUTISTA *et al.*, 1994). Como observado na IFI os AcMs anti-OPN parecem reconhecer a forma nativa da OPN produzida pela células A549, Hela MZ e Huh-7.5. Desse modo a presença de modificações específicas, como exposição de algum epítipo conformacional ou um epítipo críptico exposto pós-clivagem com alguma protease, podem ser necessárias para a ligação dos AcMs 850F49A, 1139D810G e 214911G com a OPN recombinante na análise de *Western Blot*.

A clivagem de OPN por trombina, que ocorre entre R e S no domínio GLRSKS (TUCK; CHAMBERS; ALLAN, 2007), expõe o sítio críptico de ligação à integrina (SVVYGLR). Inclusive as integrinas $\alpha_5\beta_1$ (YOKOSAKI *et al.*, 2005) e $\alpha_9\beta_1$ (YOKOSAKI *et al.*, 1999) se ligam mais efetivamente ao fragmento N-terminal da OPN clivada por trombina do que à OPN recombinante (KAZANECKI; UZWIAK; DENHARDT, 2007). Sharif (2008) produziu anticorpos específicos para detectar fragmentos de OPN clivada por trombina, os quais não se ligam a OPN intacta. O mapeamento dos epítopos realizado pelo autor determinou que os anticorpos reconhecem a tirosina, glicina, leucina e arginina encontradas no sítio críptico de ligação à integrina (SVVYGLR). Esse mesmo epítipo foi encontrado nas análises *in silico* de predição dos epítopos dos AcMs anti-OPN (Tabela 4.2) e pode ser outra hipótese para explicar porque os AcMs 850F49A, 1139D810G e 214911G não reconhecem a OPN recombinante na análise de *Western Blot*.

Utilizando métodos *in silico* um dos epítopos preditos corresponde perfeitamente ao reconhecido pelo anticorpo anti-OPN AK1H3 (SAETHSH) mapeado por Kazanecki *et al.* (2007a). No APÊNDICE D podem ser consultados outros anticorpos monoclonais anti-OPN humana, que possuem as sequências dos epítopos reconhecidos descritas na literatura, apresentando tamanho diferente a sete resíduos de aminoácido e semelhanças com as sequências de epítopos preditos na análise *in silico*.

Outro ponto importante de se notar é a reação dos AcMs contra as células de inseto, o que pode ser uma reação cruzada, ocorrendo através do reconhecimento dos motivos proteicos comuns a OPN e a proteínas de mosquitos do gênero *Aedes*. Apesar de existir genes nomeados osteopontina (ID: 115259443) e osteopontina-like (ID: 109402710) atrelados a espécie *Aedes albopictus*, essas sequências não possuem percentagem de identidade ou similaridade de aminoácidos suficiente para

serem considerados ortólogos da OPN humana (WEBER, 2018). A geração de culturas nocaute para OPN permitiria a validação da especificidade destes anticorpos conforme proposta da empresa Horizon Discovery que comercializa uma linhagem HAP-1 nocaute para o gene *SPP1* (Catalog ID:HZGHC006664c003).

5.2 GERAÇÃO DE LINHAGEM A549 DEFICIENTE EM OPN UTILIZANDO CRISPR-CAS9

A OPN está envolvida em diversas patologias, como: calcificação do tecido mole, doenças vasculares, câncer (SUBRAMAN *et al.*, 2015), doenças pulmonares (VAN DER WINDT *et al.*, 2010), infecções (ASHKAR *et al.*, 2000), entre outras. Em processos inflamatórios a OPN é altamente regulada (CHOI *et al.*, 2014) e determinar sua função nesses processos é de extrema importância. Uma ferramenta capaz de auxiliar nos estudos para desvendar o papel da OPN são linhagens celulares deficientes na produção da mesma. Assim, buscamos editar células A549 através da metodologia CRISPR-Cas9 a fim de desvendar o papel da OPN no contexto da infecção pelo DENV. A linhagem celular A549, primeiramente estabelecida por Giard *et al.* (1973) a partir de um carcinoma de pulmão humano é permissível ao DENV, tendo taxas de susceptibilidade comparáveis ao modelo celular de infecção *in vitro* padrão - Vero E6 - e produz uma resposta imunológica significativa frente a infecção, sendo assim uma boa opção para o estudo de cinética da replicação viral e indução do perfil de citocinas (YOHAN *et al.*, 2014).

No presente estudo duas estratégias foram utilizadas: 1) baseada na transfecção do complexo ribonucleoprotéico (RNP) e; 2) baseada na transfecção de um plasmídeo (PX459). A primeira estratégia apresenta boa eficiência em células eucariontes (MEDEIROS *et al.*, 2017) e menor risco de efeitos *off-target*, pois a janela de edição é menor, já que os RNPs são livres de DNA exógeno e por isso rapidamente degradados nas células quando comparados com a coexpressão dos transcritos de RNA mensageiro (para síntese de Cas9) e sgRNA induzidos pela transfecção de um plasmídeo nas células alvo (NAEEM *et al.*, 2020). Apesar desses fatores, a obtenção de uma linhagem clonal deficiente na produção de OPN empregando a primeira estratégia não teve sucesso. Ainda assim, os resultados da PCR semi-nested realizada a partir de DNA extraído destas células indicam a ocorrência de algum grau de edição. A adição do meio condicionado pode ser um motivo para o insucesso da estratégia. Embora o meio condicionado tenha sido centrifugado com o objetivo de

eliminar restos celulares e até mesmo células em suspensão, o mesmo não foi filtrado antes da adição às células transfectadas. Desse modo, há a possibilidade de que células A549 - que não passaram pelo processo de transfecção - tenham permanecido em suspensão no meio condicionado e sido semeadas juntamente às células transfectadas, dificultando ainda mais o processo de seleção da linhagem clonal deficiente em OPN. Outra possibilidade, dada a janela de edição mais curta e levando em consideração os resultados da PCR semi-nested, é que apenas um dos alelos tenha sido editado.

No caso da segunda estratégia, embora todas as culturas tenham mostrado reação positiva pela metodologia de IFI usando os AcMs 779B311E e 1139D810G, o sequenciamento e a análise de expressão gênica também indicam a ocorrência de algum grau de edição gênica.

Um ponto importante que deve ser levado em consideração é a utilização da IFI como metodologia primária para identificação das células deficientes em OPN. Uma vez que a caracterização dos AcMs não foi concluída e que os mesmos aparentam reação positiva contra todos substratos celulares testados, isso levantou um questionamento quanto a especificidade dos anticorpos que estavam sendo utilizados ao longo do desenvolvimento do trabalho. Assim, não descartamos a possibilidade de que as reações positivas observadas nas células transfectadas possam ser falsos positivos. Para tentar contornar esta limitação investimos em abordagens moleculares como sequenciamento, PCR e RT-qPCR, para verificar o processo de edição. É importante ainda lembrar que dependendo do local onde ocorre a edição e da extensão da região editada a proteína ainda pode ser sintetizada e funcional, sendo dessa forma reconhecida pelos anticorpos anti-OPN.

Atualmente podem ser encontradas pelo menos duas linhagens nocaute para OPN baseadas na edição de células HAP1 (Horizon Discovery, Cat. No. HZGHC006664c003) e HeLa (Abcam, Cat. No. ab255435) disponíveis comercialmente. Em ambos os casos, as linhagens nocaute foram geradas fazendo uso do sistema CRISPR-Cas9 tendo como alvo o éxon 6 (HAP) ou 7 (HeLa) da OPN, mesmos éxons alvo de estratégias empregadas neste trabalho. Embora, de acordo com as informações disponíveis no site dos fornecedores estas linhagens foram validadas apenas através de sequenciamento do DNA. Além disso, existem pelo menos três relatos na literatura de geração de células nocaute para OPN baseados no uso do sistema CRISPR-Cas9 (ADAMS *et al.*, 2019; HENDLEY *et al.*, 2021; WEI *et al.*, 2018), indicando que a geração destas células é factível.

5.3 MODULAÇÃO INDIRETA DA EXPRESSÃO DA OPN PELA MODULAÇÃO DA VIA HEDGEHOG

A expressão de OPN pode ser regulada pela via Hedgehog, pois a proteína é um alvo transcricional direto da via (CHOI *et al.*, 2014). Não foi possível observar diferença na expressão de OPN, quando as células A549 foram tratadas com a droga agonista (SAG) e antagonista (GDC-0449). Para analisar o diferencial de expressão esperado na OPN utilizamos a linhagem Huh-7.5, a mesma utilizada pelo artigo de referência, Choi *et al.* (2014). Mesmo após a mudança da linhagem celular, não foi possível observar diferenças na expressão de OPN. Choi *et al.* (2014) detectaram a modulação da expressão de OPN, através da técnica de RT-qPCR. Ao tratar células infectadas com o vírus da hepatite C (JFH1) com SAG foi possível observar o aumento do mRNA de OPN, já quando tratadas com o composto antagonista a expressão do mRNA de OPN voltava ao seu nível basal (nível de mRNA expresso em células não infectadas), associado a redução da carga viral. Os autores não testaram o tratamento em células não infectadas.

Outros estudos também determinaram a modulação de OPN em níveis transcricionais, através da técnica RT-qPCR (KWON *et al.*, 2016; PHILIPS *et al.*, 2011; SYN *et al.*, 2011). Na presença de SAG foi observado o aumento da expressão do mRNA de OPN em hepatócitos murinos e células estreladas hepáticas humanas (KWON *et al.*, 2016; SYN *et al.*, 2011). A diminuição da expressão do mRNA foi observada nas mesmas células quando adicionadas de GDC-0449 (PHILIPS *et al.*, 2011). A RT-qPCR é muito sensível, considerada metodologia ouro para muitos diagnósticos moleculares, pode detectar e medir quantidades mínimas de ácidos nucléicos (BUSTIN *et al.*, 2009), e dessa forma determinar a quantidade de mRNA para determinada amostra. A técnica de IFI, utilizada no presente estudo, é considerada menos sensível (MESQUITA *et al.*, 2017) e detecta a proteína de interesse. O uso dos AcMs para detecção talvez não seja o mais adequado, e análises em níveis transcricionais, como RT-qPCR, podem ser utilizadas para eliminar essa suspeita. Além disso, fatores pós-traducionais da OPN e suas proteoformas diferentes, como já discutido anteriormente, podem ser responsáveis por diferentes padrões de marcação com diferentes AcMs, impossibilitando a observação da modulação da OPN.

5.4 DINÂMICA DE MODULAÇÃO DA OSTEOPONTINA DURANTE A INFECÇÃO PELO DENV

5.4.1 Cinética de infecção em células A549

As células A549 apresentam boa suscetibilidade ao DENV (YOHAN *et al.*, 2014) e bons níveis de infecção durante a cinética. A infecção viral está associada ao aumento de citocinas inflamatórias (YOHAN *et al.*, 2014), entre elas a OPN (DEL PRETE *et al.*, 2019). Entretanto, não foi observada modulação na expressão de OPN em células de linhagem A549 quando infectadas com DENV. Isto poderia ser explicado por uma falta de sensibilidade da técnica de citometria de fluxo para detectar pequenas mudanças no nível de expressão da proteína nas células A549 que já apresentam naturalmente um certo grau de expressão da proteína (SUN *et al.*, 2016). No entanto, mesmo usando a metodologia de RT-qPCR não foi observada modulação da expressão gênica da OPN durante a infecção com DENV-4.

Os estudos que relatam modulação na expressão da OPN relacionada a infecções por DENV foram realizados em células envolvidas na resposta inflamatória, como células dendríticas (SILVEIRA *et al.*, 2011) e macrófagos (MORENO-ALTAMIRANO, 2004). Nossos resultados aliados a estes relatos prévios, indicam que o uso da linhagem A549 provavelmente não representa o modelo mais relevante para o estudo do papel desta proteína durante a infecção por DENV.

6 CONCLUSÕES

- Os anticorpos monoclonais anti-osteopontina 779B311E, 850F49A, 1139D810G e 214911G possuem cadeia pesada IgM e cadeia leve κ ;
- Os AcMs apresentam diferentes padrões de marcação sugestivos de diferença de especificidade dos mesmos;
- Apenas o AcM 779B311E reconhece a proteína recombinante pela metodologia de *Western Blot*;
- Todos os AcMs, inclusive o anticorpo comercial, apresentaram marcação positiva por imunofluorescência indireta e/ou citometria de fluxo em células C6/36, nas quais não há evidências de existência de um gene ortólogo ao *SPP1* humano;
- A partir das estratégias de edição do genoma com a ferramenta CRISPR-Cas9, não foi possível a obtenção de linhagem clonal deficiente na expressão de OPN, embora tenha sido possível evidenciar por PCR e sequenciamento sinais da ocorrência de edição gênica;
- Utilizando as drogas antagonistas e agonistas da via Hedgehog não foi possível observar modulação diferencial da proteína;
- Não foi observada a modulação de OPN em células A549 infectadas com DENV-4, MOI 0,1; 1; 5 e 10 em 6, 24 e 48 horas utilizando as técnicas citometria de fluxo e RT-qPCR.

7 PERSPECTIVAS

- Sequenciar as linhagens clonais que apresentaram expressão gênica da OPN diminuída para validar a edição gênica;
- Caso consigamos comprovar a clonalidade destas culturas e validar a edição gênica, constatando que ainda ocorre expressão gênica residual da OPN, proceder transfecção com o guia 1 a fim de obter uma linhagem clonal nocaute para ser usada na validação dos AcMs.

8 REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. R.; HTWE, H. H.; MARSH, T.; *et al.* Transcriptional control of subtype switching ensures adaptation and growth of pancreatic cancer. **eLife**, v. 8, 2019.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 6. ed. rev. São Paulo: ARTMED EDITORA LTDA, 2017.
- ALSARKHI, L.; WEBER, G. Anti-osteopontin autoantibodies in various types of cancer. **Oncology Reports**, 2018.
- ANN RAN, F.; HSU, P. D.; WRIGHT, J.; *et al.* Genome engineering using the CRIPR-Cas9 system. **Nature**, 2013.
- ANSAR, W.; GHOSH, S. Monoclonal Antibodies: A Tool in Clinical Research. **Indian Journal of Clinical Medicine**, v. 4, 2013.
- ASHKAR, S.; WEBER, G. F.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; *et al.* Eta-1 (osteopontin): An early component of type-1 (cell-mediated) immunity. **Science**, 2000.
- BAUTISTA, D. S.; XUAN, J. W.; HOTA, C.; CHAMBERS, A. F.; HARRIS, J. F. Inhibition of Arg-Gly-Asp (RGD)-mediated cell adhesion to osteopontin by a monoclonal antibody against osteopontin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 37, p. 23280–23285, 1994.
- BAYLESS, K. J.; DAVIS, G. E. Identification of Dual $\alpha 4\beta 1$ Integrin Binding Sites within a 38 Amino Acid Domain in the N-terminal Thrombin Fragment of Human Osteopontin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, 2001.
- BISSONNETTE, N.; DUDEMAINE, P. L.; THIBAUT, C.; ROBITAILLE, G. Proteomic analysis and immunodetection of the bovine milk osteopontin isoforms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 2, 2012.
- BLIGHT, K. J.; MCKEATING, J. A.; RICE, C. M. Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. **Journal of Virology**, 2002.
- BOSKEY, A. L.; MARESCA, M.; ULLRICH, W.; *et al.* Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. **Bone and Mineral**, v. 22, n. 2, 1993.
- BRADY, O. J.; GETHING, P. W.; BHATT, S.; *et al.* Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue, instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. **Dengue; Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor, Manual de Normas Técnicas**, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 60p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dengue: causas, sintomas, tratamento e prevenção. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue>>. Acesso em: 16/04/19.

BRIONES-ORTA, M. A.; AVENDAÑO-VÁZQUEZ, S. E.; APARICIO-BAUTISTA, D. I.; *et al.* Osteopontin splice variants and polymorphisms in cancer progression and prognosis. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, 2017.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 54, N. 4, p. 611–622, 2009.

CHAE, S.; JUN, H. O.; EUN, G. L.; *et al.* Osteopontin splice variants differentially modulate the migratory activity of hepatocellular carcinoma cell lines. **International Journal of Oncology**, 2009.

CHAGAN-YASUTAN, H.; LACUESTA, T. L.; NDHLOVU, L. C.; *et al.* Elevated levels of full-length and thrombin-cleaved osteopontin during acute dengue virus infection are associated with coagulation abnormalities. **Thrombosis Research**, 2014.

CHEN, R. E.; DIAMOND, M. S. Dengue mouse models for evaluating pathogenesis and countermeasures. **Current Opinion in Virology**, 2020.

CHOI, S. S.; CLARIDGE, L. C.; JHAVERI, R.; *et al.* Osteopontin is up-regulated in chronic hepatitis C and is associated with cellular permissiveness for hepatitis C virus replication. **Clinical Science**, 2014.

CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, M. S.; HASELMANN, K. F.; PETERSEN, T. E.; SØRENSEN, E. S. Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. **Biochemical Journal**, v. 390, n. 1, 2005.

CLEMENTE, N.; RAINERI, D.; CAPPELLANO, G.; *et al.* Osteopontin Bridging Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, 2006.

CRAIG, A. M.; SMITH, J. H.; DENHARDT, D. T. Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 16, 1989.

CRUZ, D. J. M.; KOISHI, A. C.; TANIGUCHI, J. B.; *et al.* High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, 2013.

- DEL PRETE, A.; SCUTERA, S.; SOZZANI, S.; MUSSO, T. Role of osteopontin in dendritic cell shaping of immune responses. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2019.
- DENDA, S.; REICHARDT, L. F.; MÜLLER, U. Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin $\alpha 8\beta 1$ and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. **Molecular Biology of the Cell**, 1998.
- DENG, S. Q.; YANG, X.; WEI, Y.; *et al.* A review on dengue vaccine development. **Vaccines**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2020.
- DESPRÈS, P.; FRENKIEL, M. P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, 1993.
- DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, 2014.
- FAN, K.; DAI, J.; WANG, HAO; *et al.* Treatment of collagen-induced arthritis with an anti-osteopontin monoclonal antibody through promotion of apoptosis of both murine and human activated T cells. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 7, p. 2041–2052, 2008.
- FISHER, L. W.; TORCHIA, D. A.; FOHR, B.; YOUNG, M. F.; FEDARKO, N. S. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2001.
- FRANZÉN, A.; HEINEGÅRD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochemical Journal**, v. 232, n. 3, 1985.
- GIARD, D. J.; AARONSON, S. A.; TODARO, G. J.; *et al.* In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1417–1423, 1973.
- GIMBA, E. R.; TILLI, T. M. Human osteopontin splicing isoforms: Known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. **Cancer Letters**, 2013.
- GOPARAJU, C. M. V.; PASS, H. I.; BLASBERG, J. D.; HIRSCH, N.; DONINGTON, J. S. Functional heterogeneity of osteopontin isoforms in non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, 2010.
- GREEN, P. M.; LUDBROOK, S. B.; MILLER, D. D.; HORGAN, C. M. T.; BARRY, S. T. Structural elements of the osteopontin SVVYGLR motif important for the interaction with $\alpha 4$ integrins. **FEBS Letters**, v. 503, n. 1, 2001.
- HAIMES, J; KELLEY, M. Demonstration of a $\Delta\Delta Cq$ Calculation Method to Compute Relative Gene Expression from qPCR Data. Tech note [2013]. Disponível em: <<https://horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/Technical-manuals/delta-cq-solaris-technote.pdf>>. Acesso em: 28/11/2021.

- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science**, 1988.
- HE, B.; MIRZA, M.; WEBER, G. F. An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells. **Oncogene**, 2006.
- HENDLEY, A. M.; RAO, A. A.; LEONHARDT, L.; *et al.* Single-cell transcriptome analysis defines heterogeneity of the murine pancreatic ductal tree. **eLife**, v. 10, 2021.
- HOTTA, S. Experimental Studies on Dengue: I. Isolation, Identification and Modification of the Virus. **Journal of Infectious Diseases**, 1952.
- HU, D. D.; LIN, E. C. K.; KOVACH, N. L.; HOYER, J. R.; SMITH, J. W. A Biochemical Characterization of the Binding of Osteopontin to Integrins $\alpha\beta 1$ and $\alpha\beta 5$. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 44, 1995.
- HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262–1278, 2014.
- HYNES, R. O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, n. 1, 1992.
- IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. **Journal of General Virology**, 1978.
- INOUE, M.; SHINOHARA, M. L. Intracellular osteopontin (iOPN) and immunity. **Immunologic Research**, v. 49, n. 1–3, 2011.
- KAZANECKI, C. C.; KOWALSKI, A. J.; DING, T.; RITTLING, S. R.; DENHARDT, D. T. Characterization of anti-osteopontin monoclonal antibodies: Binding sensitivity to post-translational modifications. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 925–935, 2007a.
- KAZANECKI, C. C.; UZWIAK, D. J.; DENHARDT, D. T. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 912–924, 2007b.
- KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. **Fields virology**. Philadelphia, Pa.: Wolters Kluwer; Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, 1975.
- KWON, H.; SONG, K.; HAN, C.; *et al.* Inhibition of hedgehog signaling ameliorates hepatic inflammation in mice with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 63, n. 4, p. 1155–1169, 2016.
- LIEW, K. J. L.; CHOW, V. T. K. Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. **Journal of Virological Methods**, v. 131, n. 1, 2006.

- LIPMAN, N. S.; JACKSON, L. R.; TRUDEL, L. J.; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 258–268, 2005.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOW, J. G. H.; OOI, E. E.; VASUDEVAN, S. G. Current status of dengue therapeutics research and development. **Journal of Infectious Diseases**, 2017.
- MANDEL, M.; HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. **Journal of Molecular Biology**, 1970.
- MARCHUK, D.; DRUMM, M.; SAULINO, A.; COLLINS, F. S. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. **Nucleic Acids Research**, 1991.
- MAZZAROTTO, G. A. C. A.; RABONI, S. M.; STELLA, V.; *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of *Araucaria* hantavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 162, n. 1–2, p. 96–100, 2009.
- MEDEIROS, L. C. S.; SOUTH, L.; PENG, D.; *et al.* Rapid, selection-free, high-efficiency genome editing in protozoan parasites using CRISPR-cas9 ribonucleoproteins. **mBio**, 2017.
- MEDHORA, M. M.; TEITELBAUM, S.; CHAPPEL, J.; *et al.* 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ up-regulates expression of the osteoclast integrin α v β 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 2, 1993.
- MESQUITA, S.; BRUNA, D.; OLIVEIRA, L. DE; *et al.* Rapid antigen detection test for respiratory syncytial virus diagnosis as a diagnostic tool. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 3, p. 246–252, 2017. Sociedade Brasileira de Pediatria.
- MOORMAN, H. R.; POSCHEL, D.; KLEMENT, J. D.; *et al.* Osteopontin: A Key Regulator of Tumor Progression and Immunomodulation. **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3379, 2020.
- MORENO-ALTAMIRANO, M. M. B.; ROMANO, M.; LEGORRETA-HERRERA, M.; SÁNCHEZ-GARCÍA, F. J.; COLSTON, M. J. Gene expression in human macrophages infected with dengue virus serotype-2. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 60, n. 6, p. 631–638, 2004.
- NAEEM, M.; MAJEED, S.; HOQUE, M. Z.; AHMAD, I. Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1–23, 2020.
- OLDBERG, A.; FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 23, 1986.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Fiebre por Dengue en las Américas. Número de Casos Reportados por País o Territorio. Disponível em: <<http://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html>>. Acesso em: 16/04/2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Dengue fever in the Americas Number of Reported Cases by Country or Territory. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>>. Acesso em: 24/05/2021.

OSANAI, C. H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TANG, A. T.; *et al.* Surto De Dengue Em Boa Vista, Roraima. Nota Previa. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 1983.

PASCAPURNAMA, D. N.; LABAYO, H. K. M.; DAPAT, I.; *et al.* Induction of osteopontin by dengue virus-3 infection in THP-1 cells: Inhibition of the synthesis by brefelamide and its derivative. **Frontiers in Microbiology**, 2017.

PHILIPS, G. M.; CHAN, I. S.; SWIDERSKA, M.; *et al.* Hedgehog signaling antagonist promotes regression of both liver fibrosis and hepatocellular carcinoma in a murine model of primary liver cancer. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 1952.

SENGER, D. R.; PERRUZZI, C. A.; PAPADOPOULOS, A. Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. **Anticancer Research**, 1989.

SENGER, D. R.; WIRTH, D. F.; HYNES, R. O. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. **Cell**, 1979.

SHARIF, S. Characterization of antibodies for osteopontin fragments in rheumatoid arthritis. Orientador: Dr. William Murray. 2008. 45 f. Tese (Mestrado) - The Faculty of the Department of Biological Sciences, San Jose State University, 2008.

SHEN, H.; WEBER, G. F. The osteopontin-c splice junction is important for anchorage-independent growth. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 6, 2014.

SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A.; STANAWAY, J. D. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, 2016.

SHINOHARA, M. L.; KIM, H. J.; KIM, J. H.; GARCIA, V. A.; CANTOR, H. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2008.

SILVA, G. R.; MATTOS, D. S.; BASTOS, A. C. F.; *et al.* Osteopontin-4 and Osteopontin-5 splice variants are expressed in several tumor cell lines. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 10, p. 8339–8345, 2020. Springer Netherlands.

- SILVEIRA, G. F.; MEYER, F.; DELFRARO, A.; *et al.* Dengue Virus Type 3 Isolated from a Fatal Case with Visceral Complications Induces Enhanced Proinflammatory Responses and Apoptosis of Human Dendritic Cells. **Journal of Virology**, v. 85, n. 11, 2011.
- SMITH, L. M.; KELLEHER, N. L. Proteoform: a single term describing protein complexity. **Nature Methods**, v. 10, n. 3, 2013.
- SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M. D. Osteopontin. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 3, 2000.
- SUBRAMAN, V.; THIYAGARAJAN, M.; MALATHI, N.; RAJAN, S. T. OPN - Revisited. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 2015.
- SUHARTI, C.; VAN GORP, E. C. M.; SETIATI, T. E.; *et al.* The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. **Thrombosis and Haemostasis**, 2002.
- SULLIVAN, J.; BLAIR, L.; ALNAJAR, A.; *et al.* Expression of a prometastatic splice variant of osteopontin, OPNC, in human pancreatic ductal adenocarcinoma. **Surgery**, 2009.
- SUN, S.-J.; WU, C.-C.; SHEU, G.-T.; *et al.* Integrin $\beta 3$ and CD44 levels determine the effects of the OPN-a splicing variant on lung cancer cell growth. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55572–55584, 2016.
- SYN, W. K.; CHOI, S. S.; LIASKOU, E.; *et al.* Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 53, n. 1, p. 106–115, 2011.
- TSCHÁ, M. K.; SUZUKAWA, A. A.; GRÄF, T.; *et al.* Identification of a novel alphavirus related to the encephalitis complexes circulating in southern Brazil. **Emerging Microbes and Infections**, v. 8, n. 1, p. 920–933, 2019.
- TUCK, A. B.; CHAMBERS, A. F.; ALLAN, A. L. Osteopontin overexpression in breast cancer: Knowledge gained and possible implications for clinical management. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2007.
- VAN DER WINDT, G. J. W.; HOOGERWERF, J. J.; DE VOS, A. F.; FLORQUIN, S.; VAN DER POLL, T. Osteopontin promotes host defense during *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumonia. **European Respiratory Journal**, 2010.
- VARMA, M. G. R.; PUDNEY, M.; LEAKE, C. J. Cell lines from larvae of aedes (stegomyia) malayensis colless and aedes (s) pseudoscutellaris (theobald) and their infection with some arboviruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1974.
- WEBER, G. F. The phylogeny of osteopontin—Analysis of the protein sequence. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

WEI, J.; MARISSETTY, A.; SCHRAND, B.; *et al.* Osteopontin mediates glioblastoma-associated macrophage infiltration and is a potential therapeutic target. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 1, p. 137–149, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue control. Disponível em: <<https://www.who.int/denguecontrol/disease/en/>>. Acesso em: 13/08/2019a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, REPORT. Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 – Recommendations. **Vaccine**, v. 37, n. 35, p. 4848–4849, 2019b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe dengue. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 01/04/2021.

WU, J., WANG, X. Isolation of SIBLING Proteins from Bone and Dentin Matrices. In: PAPAGERAKIS, P. **Odontogenesis. Methods in Molecular Biology**, vol 1922. New York, NY. Humana Press, 2019. p. 211-218.

YOHAN, B.; KENDARSARI, R. I.; MUTIA, K.; *et al.* Growth characteristics and cytokine/chemokine induction profiles of dengue viruses in various cell lines. **Acta virologica**, v. 58, n. 1, p. 20–27, 2014.

YOKOSAKI, Y.; MATSUURA, N.; SASAKI, T.; *et al.* The integrin $\alpha 9\beta 1$ binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. **Journal of Biological Chemistry**, 1999.

YOKOSAKI, Y.; TANAKA, K.; HIGASHIKAWA, F.; YAMASHITA, K.; EBOSHIDA, A. Distinct structural requirements for binding of the integrins $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 9\beta 1$ to osteopontin. **Matrix Biology**, 2005.

YOUNG, M. F.; KERR, J. M.; TERMINE, J. D.; *et al.* cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). **Genomics**, v. 7, n. 4, 1990.

ZOHAR, R.; SUZUKI, N.; SUZUKI, K.; *et al.* Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 184, n. 1, 2000.

9 APÊNDICE A

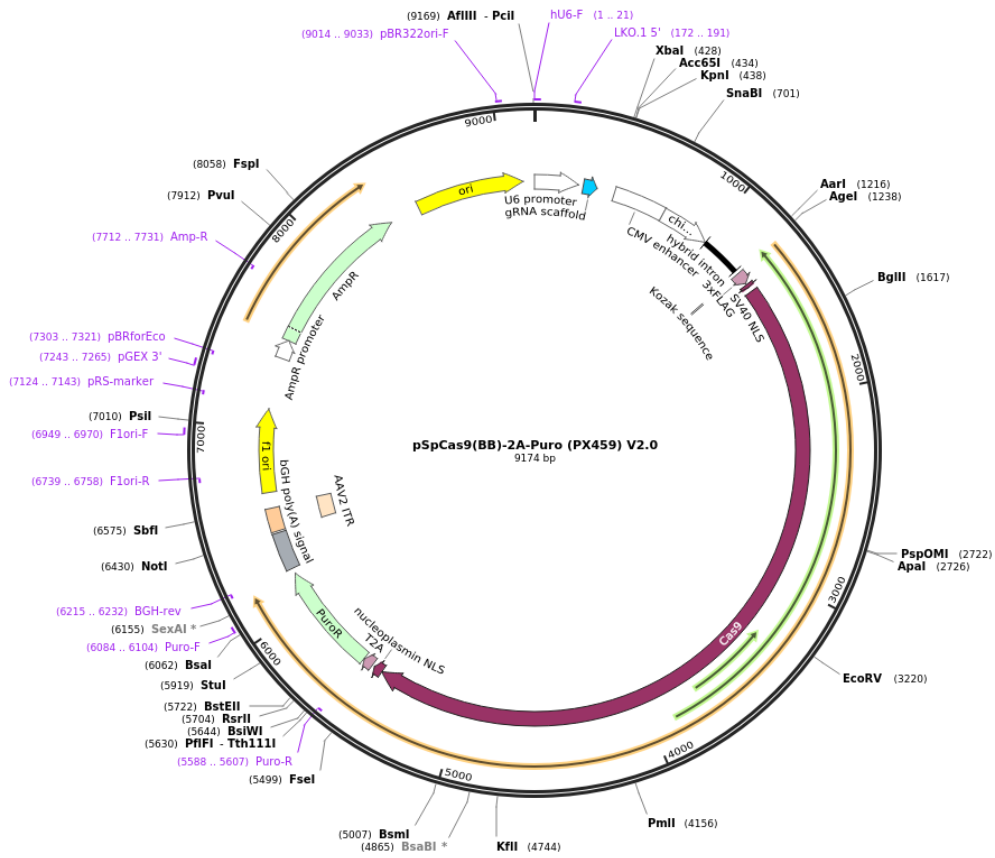
Sequência correspondente aos produtos das PCRs geradas na estratégia de geração da linhagem A549 deficiente em OPN utilizando a transfecção do RNP.

Produto de PCR	
sgRNA éxon 2	GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCATCACCTGTGCCATACCAGT TTTAGTACTCTGTAATTTTAGGTATGAGGTAGACGAAAATTGTA CTTATACCTA AAATTACAGAATCTACTAAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTT GTTGGCGAGATTTTTTTT
sgRNA éxon 6	GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGACATCAGAGTCGTTCCGAGTCAAGT TTTAGTACTCTGTAATTTTAGGTATGAGGTAGACGAAAATTGTA CTTATACCTA AAATTACAGAATCTACTAAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTT GTTGGCGAGATTTTTTTT
sgRNA éxon 7	GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGATCACCTCACACATGGAAAGCGGT TTTAGTACTCTGTAATTTTAGGTATGAGGTAGACGAAAATTGTA CTTATACCTA AAATTACAGAATCTACTAAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTT GTTGGCGAGATTTTTTTT
DNA doador - éxon 2	AAATATATTTTATTTGTGATCATTTTGTAATGTGGTAGTATAAAAAAGGTATCAC TGTTGTAACCTATGAAGATGTCAGCTATTCCTTATGAAATATTTTGCAGGAAAA CTCACTACCATGAGAATTGCAGTGATTTGCTTTTGCCCTCCTA TAGATAGATAGT GTAAAACGACGGCCAGTACAGTTGCATCTTAAAGAAAATTCCTGAAAATAACTG AATTGTGTGCTTCCATGTGCTAGGAGGACATTCTTGTAATCTTTCCTTCATCTTT TCTGTTTCTAAGGTAAACAGGCTGATTCTGGAAGTTCTGAGGAAAAGCAGGTA AGCAT
DNA doador - éxon 6	TGCTATAAAGGCTAAGGGAAAAATAAAAACCCATATATTAATTTTCCCGGCCATC TTAATTTTCAGACCCCTTCCAAGTAAGTCCAACGAAAGCCATGACCACATGGATG ATATGGATGATGAAGATGATGATGACCATGTGGACAGCCAGG TAGATAGATAGT GTAAAACGACGGCCAGTATGTAGATGACACTGATGATTCTCACCAGTCTGATGA GTCTCACCATTCTGATGAATCTGATGAACTGGTCACCTGATTTTCCCACGGACCT GCCAGCAACCGAAGTTTCACTCCAGTTGTCCCGTGATAGTGTGGTTTATGGAC TGAGG
DNA doador - éxon 7	TTAAACTAAATGAGATGACATATGTGA AAGGCCTTGGTAAAGTACTATACAAAG TAACATGCTAGTATTATTTTCCAGCCAGATTTAGACAAATTTTAGTATAAGATGAC CTAAAAGCTAGAGAGTGGAAAAGGATTACATATTTCCCATCC TAGATAGATAGTG TAAAACGACGGCCAGTTGAATGGTGCATACAAGGCCATCCCCGTTGCCAGGAC CTGAACGCGCCTTCTGATTGGGACAGCCGTGGGAAGGACAGTTATGAAACGAGT CAGCTGGATGACCAGAGTGCTGAAACCCACAGCCACAAGCAGTCCAGATTATAT AAGC

Em azul: sequência referente ao *primer forward*. Verde: sequência referente ao *primer reverse*. Vermelho: sequência referente aos *stop* códons nas três fases de leitura. Roxo: sequência referente ao M13. Autoria própria, 2020.

10 APÊNDICE B

Created with SnapGene®



Estrutura PX459. Fonte: Addgene plasmid ID: 62988.

11 APÊNDICE C

Representação das sequências encontradas em proteínas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* homólogas aos epítomos preditos para os AcMs.

<p>Alignments: >uncharacterized protein K02A2.6-like [<i>Aedes albopictus</i>] Sequence ID: XP_029711005.1 Length: 447 Range 1: 386 to 392</p> <p>Score:22.7 bits(46), Expect:3.7, Method:, Identities:7/7(100%), Positives:7/7(100%), Gaps:0/7(0%)</p> <p>Query 1 ADSGSSE 7 ADSGSSE Sbjct 386 ADSGSSE 392</p>	<p>>modifier of mdg4 isoform X10 [<i>Aedes aegypti</i>] Sequence ID: XP_021693972.1 Length: 559 Range 1: 375 to 381</p> <p>Score:24.8 bits(51), Expect:0.64, Method:, Identities:7/7(100%), Positives:7/7(100%), Gaps:0/7(0%)</p> <p>Query 1 AQDLNAP 7 AQDLNAP Sbjct 375 AQDLNAP 381</p>
<p>>AAEL005871-PA [<i>Aedes aegypti</i>] Sequence ID: EAT42593.1 Length: 835 Range 1: 132 to 138</p> <p>Score:25.2 bits(52), Expect:0.45, Method:, Identities:7/7(100%), Positives:7/7(100%), Gaps:0/7(0%)</p> <p>Query 1 SHHSDES 7 SHHSDES Sbjct 132 SHHSDES 138</p>	<p>>uncharacterized protein LOC115265418 isoform X1 [<i>Aedes albopictus</i>] Sequence ID: XP_029726286.1 Length: 2769 Range 1: 564 to 570</p> <p>Score:28.2 bits(59), Expect:0.039, Method:, Identities:7/7(100%), Positives:7/7(100%), Gaps:0/7(0%)</p> <p>Query 1 DMDEDD 7 DMDEDD Sbjct 564 DMDEDD 570</p>
<p>>adenomatous polyposis coli protein-like [<i>Aedes aegypti</i>] Sequence ID: XP_021695067.1 Length: 2420 Range 1: 2032 to 2038</p> <p>Score:28.2 bits(59), Expect:0.039, Method:, Identities:7/7(100%), Positives:7/7(100%), Gaps:0/7(0%)</p> <p>Query 1 MDEDDDD 7 MDEDDDD Sbjct 2032 MDEDDDD 2038</p>	<p>>hypothetical protein RP20_CCG025117 [<i>Aedes albopictus</i>] Sequence ID: KXJ70027.1 Length: 980 Range 1: 183 to 189</p> <p>Score:24.0 bits(49), Expect:1.3, Method:, Identities:7/7(100%), Positives:7/7(100%), Gaps:0/7(0%)</p> <p>Query 1 LSKVSRE 7 LSKVSRE Sbjct 183 LSKVSRE 189</p>
<p>>SH3 domain-containing protein C23A1.17-like [<i>Aedes albopictus</i>] Sequence ID: XP_029723166.1 Length: 1035 Range 1: 993 to 999</p> <p>Score:25.7 bits(53), Expect:0.32, Method:, Identities:7/7(100%), Positives:7/7(100%), Gaps:0/7(0%)</p> <p>Query 1 PDATDED 7 PDATDED Sbjct 993 PDATDED 999</p>	<p>>uncharacterized protein LOC115260004, partial [<i>Aedes albopictus</i>] Sequence ID: XP_029716700.1 Length: 227 Range 1: 220 to 226</p> <p>Score:23.5 bits(48), Expect:1.9, Method:, Identities:7/7(100%), Positives:7/7(100%), Gaps:0/7(0%)</p> <p>Query 1 LRSKSKK 7 LRSKSKK Sbjct 220 LRSKSKK 226</p>
<p>>probable glutamate receptor [<i>Aedes aegypti</i>] Sequence ID: XP_021695736.1 Length: 622 Range 1: 238 to 244</p> <p>Score:24.4 bits(50), Expect:0.91, Method:, Identities:7/7(100%), Positives:7/7(100%), Gaps:0/7(0%)</p> <p>Query 1 VAQDLNA 7 VAQDLNA Sbjct 238 VAQDLNA 244</p>	<p>>ankyrin repeat and KH domain-containing protein mask isoform X1 [<i>Aedes aegypti</i>] Sequence ID: XP_021694133.1 Length: 4015 Range 1: 260 to 266</p> <p>Score:26.9 bits(56), Expect:0.11, Method:, Identities:7/7(100%), Positives:7/7(100%), Gaps:0/7(0%)</p> <p>Query 1 DEEDDDD 7 DEEDDDD Sbjct 260 DEEDDDD 266</p>

Autoria própria, 2021.

A informação contendo todas as proteínas com 100% de identidade aos epítomos preditos pode ser consultada na tabela abaixo.

Tabela – Epítomos preditos que possuem sequências homólogas a proteínas encontradas em mosquitos pertencentes às espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

Possível Epítopo	Proteína	Acesso (ID)	Espécie	Score máximo	Score Total	Query cover	Valor E	Porcentagem de Identidade
ADSGSSE	uncharacterized protein K02A2.6-like	XP_029711005.1	<i>Aedes albopictus</i>	22,7	22,7	100%	3,7	100,00
AQDLNAP	modifier of mdg4 isoform X10	XP_021693972.1	<i>Aedes aegypti</i>	24,8	24,8	100%	0,64	100,00
	46 kDa FK506-binding nuclear protein	XP_021695012.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	413	100%	0,11	100,00
	46 kDa FK506-binding nuclear protein isoform X1	XP_029710496.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	417	100%	0,11	100,00
	46 kDa FK506-binding nuclear protein isoform X2	XP_029710497.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	417	100%	0,11	100,00
	AAEL002788-PA	EAT45956.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	63,8	100%	0,11	100,00
	AAEL002896-PA	EAT45843.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	68,1	100%	0,11	100,00
	AAEL003009-PA	EAT45742.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	48,8	100%	0,11	100,00
	AAEL003303-PA	EAT45400.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	454	100%	0,11	100,00
	AAEL003875-PA	EAT44798.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	105	100%	0,11	100,00
	AAEL004493-PA	EAT44108.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	92,5	100%	0,11	100,00
	AAEL004942-PA	EAT43621.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	186	100%	0,11	100,00
	AAEL004942-PB	EAT43622.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	145	100%	0,11	100,00
DDEDDDD	AAEL006394-PA	EAT42022.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	47,9	100%	0,11	100,00
	AAEL006881-PA, partial	EAT41473.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	AAEL008318-PA, partial	EAT39924.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	43,7	100%	0,11	100,00
	AAEL008748-PA	EAT39454.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	64,3	100%	0,11	100,00
	AAEL009080-PA	EAT39091.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	114	100%	0,11	100,00
	AAEL009080-PB	EAT39090.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	114	100%	0,11	100,00
	AAEL013023-PA	EAT34770.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	321	100%	0,11	100,00
	AAEL017042-PA	EJY57606.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	26,9	100%	0,12	100,00
	actin cytoskeleton-regulatory complex protein PAN1	XP_001663917.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	109	100%	0,11	100,00
	afadin isoform X4	XP_021692989.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	66,4	100%	0,11	100,00
	afadin-like isoform X1	XP_029716424.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	45,4	100%	0,11	100,00
	afadin-like isoform X2	XP_029716426.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	45,4	100%	0,11	100,00

Possível Epítopo	Proteína	Acesso (ID)	Espécie	Score máximo	Score Total	Query cover	Valor E	Porcentagem de Identidade
	afadin-like isoform X3	XP_029716427.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	45,4	100%	0,11	100,00
	ankyrin repeat and KH domain-containing protein mask isoform X1	XP_021694133.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	ankyrin repeat and KH domain-containing protein mask isoform X2	XP_021694134.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	ankyrin repeat and KH domain-containing protein mask isoform X3	XP_021694135.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	ankyrin repeat and KH domain-containing protein mask isoform X4	XP_021694136.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	ankyrin repeat and KH domain-containing protein mask isoform X5	XP_021694137.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	ankyrin repeat and KH domain-containing protein mask isoform X6	XP_021694138.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	ankyrin repeat and KH domain-containing protein mask isoform X7	XP_021694139.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase isoform X2	XP_029726021.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	594	100%	0,11	100,00
	aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase isoform X3	XP_029726022.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	601	100%	0,11	100,00
	aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase isoform X4	XP_029726023.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	280	100%	0,11	100,00
	aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase isoform X5	XP_029726024.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	594	100%	0,11	100,00
	aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase isoform X6	XP_029726026.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	287	100%	0,11	100,00
	ATP-dependent helicase brm isoform X1	XP_001650089.2	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	186	100%	0,11	100,00
	ATP-dependent helicase brm isoform X2	XP_021706777.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	186	100%	0,11	100,00
	cilia- and flagella-associated protein 251-like isoform X2	XP_021705856.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	65,5	100%	0,11	100,00
	coiled-coil domain-containing protein 1-like isoform X1	XP_019543469.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	1081	100%	0,11	100,00
	coiled-coil domain-containing protein 1-like isoform X1	XP_029707874.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	1109	100%	0,11	100,00
	cysteine protease ATG4D	XP_019528840.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	44,5	100%	0,11	100,00
	cysteine protease ATG4D	XP_019524928.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	44,5	100%	0,11	100,00
	DDB1- and CUL4-associated factor 6-like	XP_029711687.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	158	100%	0,11	100,00
	E3 ubiquitin-protein ligase RNF13 isoform X1	XP_021709467.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	48,8	100%	0,11	100,00

Possível Epítopo	Proteína	Acesso (ID)	Espécie	Score máximo	Score Total	Query cover	Valor E	Porcentagem de Identidade
	E3 ubiquitin-protein ligase RNF13 isoform X2	XP_021709469.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	48,8	100%	0,11	100,00
	furin-like protease 2 isoform X1	XP_029734795.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	87,8	100%	0,11	100,00
	furin-like protease 2 isoform X2	XP_029734798.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	87,8	100%	0,11	100,00
	high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A-like isoform X1	XP_029723096.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A-like isoform X1	XP_029723073.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A-like isoform X2	XP_029723098.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A-like isoform X2	XP_029723075.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A-like isoform X3	XP_029723102.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A-like isoform X3	XP_029723078.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A-like isoform X4	XP_029723107.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A-like isoform X5	XP_029723110.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	histone-lysine N-methyltransferase Suv4-20-like	XP_029710498.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	143	100%	0,11	100,00
	homeobox protein 2-like	XP_029716486.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG000938	KXJ68943.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	355	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG002131	KXJ68689.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG002971	KXJ78939.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	123	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG006872	KXJ77633.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	136	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG007760	KXJ77337.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG009392	KXJ76576.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	217	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG009415	KXJ84355.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	68,1	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG010928	KXJ75840.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	865	100%	0,11	100,00

Possível Epítopo	Proteína	Acesso (ID)	Espécie	Score máximo	Score Total	Query cover	Valor E	Porcentagem de Identidade
	hypothetical protein RP20_CCG010995	KXJ75792.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	132	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG011449	KXJ75567.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	108	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG011567	KXJ75486.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	43,7	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG013411	KXJ74550.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG014060	KXJ74254.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	143	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG023764	KXJ70404.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	417	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG024488	KXJ70193.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	73,2	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG025733	KXJ80287.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	44,5	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG026061	KXJ69711.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	44,5	100%	0,12	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG026326	KXJ69645.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	47,9	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG026647	KXJ69548.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	136	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG026756	KXJ69481.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	45,4	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG027143	KXJ84530.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	280	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG028369	KXJ79692.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	107	100%	0,11	100,00
	importin-7	XP_021695478.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	114	100%	0,11	100,00
	importin-7-like	XP_019538752.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	111	100%	0,11	100,00
	LOW QUALITY PROTEIN: 46 kDa FK506-binding nuclear protein-like	XP_019552375.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	373	100%	0,11	100,00
	LOW QUALITY PROTEIN: histone-lysine N-methyltransferase Suv4-20	XP_019558596.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	146	100%	0,11	100,00
	LOW QUALITY PROTEIN: histone-lysine N-methyltransferase trithorax, partial	XP_019546363.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	308	100%	0,11	100,00
	LOW QUALITY PROTEIN: multiple C2 and transmembrane domain-containing protein-like	XP_029719739.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	LOW QUALITY PROTEIN: protein kibra	XP_029729379.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	73,2	100%	0,11	100,00
	LOW QUALITY PROTEIN: protein kibra-like	XP_029709674.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	73,2	100%	0,11	100,00
	LOW QUALITY PROTEIN: protein lava lamp-like	XP_019559715.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	47,9	100%	0,11	100,00

Possível Epítopo	Proteína	Acesso (ID)	Espécie	Score máximo	Score Total	Query cover	Valor E	Porcentagem de Identidade
	LOW QUALITY PROTEIN: transcription elongation factor SPT5-like	XP_029714941.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC115270262	XP_029735387.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	107	100%	0,11	100,00
	LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC115270263	XP_029735392.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	107	100%	0,11	100,00
	mRNA turnover protein 4 homolog	XP_019553818.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	157	100%	0,11	100,00
	multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X1	XP_001652305.2	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X2	XP_021695991.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1 isoform X3	XP_021695992.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	multiple C2 and transmembrane domain-containing protein isoform X1	XP_019553820.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	multiple C2 and transmembrane domain-containing protein isoform X2	XP_019553821.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	multiple C2 and transmembrane domain-containing protein isoform X3	XP_019553822.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	nuclear RNA export factor 2	XP_019558233.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	43,7	100%	0,11	100,00
	nucleolin-like isoform X1	XP_021706953.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	1112	100%	0,11	100,00
	nucleolin-like isoform X2	XP_029707876.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	868	100%	0,11	100,00
	nucleolin-like isoform X2	XP_019543470.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	840	100%	0,11	100,00
	nucleolin-like isoform X2	XP_021706954.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	871	100%	0,11	100,00
	nucleolin-like isoform X3	XP_019543471.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	840	100%	0,11	100,00
	nucleolin-like isoform X3	XP_029707877.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	868	100%	0,11	100,00
	PHD finger protein 14	XP_029717645.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	218	100%	0,11	100,00
	PHD finger protein 14-like	XP_019548346.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	218	100%	0,11	100,00
	polycomb protein Asx isoform X1	XP_029731487.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	80,2	100%	0,11	100,00

Possível Epítopo	Proteína	Acesso (ID)	Espécie	Score máximo	Score Total	Query cover	Valor E	Porcentagem de Identidade
	polycomb protein Asx isoform X2	XP_029731488.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	80,2	100%	0,11	100,00
	polycomb protein Asx isoform X3	XP_029731489.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	80,2	100%	0,11	100,00
	polycomb protein Asx isoform X4	XP_029731490.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	80,2	100%	0,11	100,00
	polycomb protein Asx isoform X5	XP_029731491.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	80,2	100%	0,11	100,00
	polycomb protein Asx isoform X7	XP_029731492.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	80,2	100%	0,11	100,00
	pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog isoform X1	XP_021703752.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	92,5	100%	0,11	100,00
	pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog isoform X2	XP_001649282.2	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	92,5	100%	0,11	100,00
	probable serine/threonine-protein kinase kinX isoform X1	XP_021705855.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	65,5	100%	0,11	100,00
	proton channel OtopLc isoform X1	XP_029717766.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	44,5	100%	0,11	100,00
	proton channel OtopLc-like isoform X1	XP_019553505.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	44,5	100%	0,11	100,00
	proton channel OtopLc-like isoform X1	XP_029717759.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	44,5	100%	0,11	100,00
	putative uncharacterized protein DDB_G0291812 isoform X1	XP_029717599.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	199	100%	0,11	100,00
	putative uncharacterized protein DDB_G0291812 isoform X2	XP_029717600.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	199	100%	0,11	100,00
	putative uncharacterized protein DDB_G0293878 isoform X3	XP_029717601.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	199	100%	0,11	100,00
	putative uncharacterized protein DDB_G0293878 isoform X4	XP_029717602.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	199	100%	0,11	100,00
	putative uncharacterized protein DDB_G0293878 isoform X5	XP_029717603.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	199	100%	0,11	100,00
	RNA-binding protein 28-like	XP_019563069.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	244	100%	0,11	100,00
	serine/arginine repetitive matrix protein 2	XP_001653059.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	transcription elongation factor SPT5	XP_001663723.2	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	transcription elongation factor SPT5-like	XP_029714951.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	transcription factor grauzone isoform X1	XP_001661157.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	109	100%	0,11	100,00
	transcription factor Sp4 isoform X1	XP_021710244.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	105	100%	0,11	100,00
	transcription factor Sp4 isoform X2	XP_021710246.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	105	100%	0,11	100,00

Possível Epítopo	Proteína	Acesso (ID)	Espécie	Score máximo	Score Total	Query cover	Valor E	Porcentagem de Identidade
	transcription factor Sp4 isoform X3	XP_021710247.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	105	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC109409291	XP_019538276.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC109409693 isoform X1	XP_029726019.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	594	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC109419532	XP_029714805.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC109422876 isoform X1	XP_029724024.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	118	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC109422876 isoform X2	XP_029724025.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	118	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC109423802	XP_029735451.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	107	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC109424755	XP_029710668.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	696	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC110674285	XP_021694256.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	114	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC110675641	XP_021696886.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	99	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC110678164	XP_021706480.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	505	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC110680830	XP_021712312.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	156	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC115254766	XP_029708293.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	94,2	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC115268901	XP_029732963.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	163	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC23687462	XP_021696794.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	26,9	100%	0,12	100,00
	uncharacterized protein LOC5565491	XP_021694725.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	600	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5567948	XP_021707012.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	47,9	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5570105 isoform X1	XP_021693271.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5570105 isoform X2	XP_021693299.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5570105 isoform X3	XP_021693304.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5570105 isoform X4	XP_021693312.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5570105 isoform X5	XP_021693316.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5570105 isoform X6	XP_021693327.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5570105 isoform X7	XP_021693330.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	147	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5571018	XP_021709046.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	61,7	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5576462 isoform X1	XP_021700291.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	114	100%	0,11	100,00

Possível Epítipo	Proteína	Acesso (ID)	Espécie	Score máximo	Score Total	Query cover	Valor E	Porcentagem de Identidade
	uncharacterized protein LOC5576462 isoform X2	XP_021700302.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	114	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5576462 isoform X3	XP_021700312.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	114	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5576462 isoform X4	XP_021700320.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	114	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5577127 isoform X1	XP_021701683.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	160	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5577127 isoform X2	XP_021701684.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	160	100%	0,11	100,00
	uncharacterized protein LOC5579245	XP_021699518.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	USP6 N-terminal-like protein isoform X1	XP_029712250.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	105	100%	0,11	100,00
	zinc finger CCCH domain-containing protein 15 homolog	XP_021701416.1	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	88,7	100%	0,11	100,00
	zinc finger protein 148	XP_019527911.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	zinc finger protein 148-like	XP_019528594.2	<i>Aedes aegypti</i>	26,9	62,1	100%	0,11	100,00
	zinc finger protein 148-like	XP_021713296.1	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	83,1	100%	0,11	100,00
	zinc finger protein Xfin-like	XP_019931236.2	<i>Aedes albopictus</i>	26,9	26,9	100%	0,11	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG006267	KXJ68041.1	<i>Aedes albopictus</i>	28,2	76,8	100%	0,039	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG011449	KXJ75567.1	<i>Aedes albopictus</i>	28,2	66,4	100%	0,040	100,00
DMDDEDD	LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC109409016	XP_029716652.1	<i>Aedes albopictus</i>	28,2	76,8	100%	0,039	100,00
	mRNA turnover protein 4 homolog	XP_019553818.2	<i>Aedes albopictus</i>	28,2	66,4	100%	0,040	100,00
	uncharacterized protein LOC115265418 isoform X1	XP_029726285.1	<i>Aedes albopictus</i>	28,2	76,8	100%	0,039	100,00
	uncharacterized protein LOC115265418 isoform X2	XP_029726287.1	<i>Aedes albopictus</i>	28,2	76,8	100%	0,039	100,00
	AAEL009821-PA	EAT38282.1	<i>Aedes aegypti</i>	23,1	23,1	100%	2,6	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG019931	KXJ71675.1	<i>Aedes albopictus</i>	23,1	37,3	100%	2,6	100,00
	uncharacterized protein LOC109406739 isoform X1	XP_029733046.1	<i>Aedes albopictus</i>	23,1	37,3	100%	2,6	100,00
DSASSEV	uncharacterized protein LOC109406739 isoform X2	XP_029733049.1	<i>Aedes albopictus</i>	23,1	37,3	100%	2,6	100,00
	uncharacterized protein LOC109406739 isoform X3	XP_029733050.1	<i>Aedes albopictus</i>	23,1	37,3	100%	2,6	100,00
	uncharacterized protein LOC109411935 isoform X1	XP_029733015.1	<i>Aedes albopictus</i>	23,1	37,3	100%	2,6	100,00
	uncharacterized protein LOC109411935 isoform X2	XP_029733021.1	<i>Aedes albopictus</i>	23,1	37,3	100%	2,6	100,00
	uncharacterized protein LOC109411935 isoform X3	XP_029733022.1	<i>Aedes albopictus</i>	23,1	37,3	100%	2,6	100,00

Possível Epítopo	Proteína	Acesso (ID)	Espécie	Score máximo	Score Total	Query cover	Valor E	Porcentagem de Identidade
	uncharacterized protein LOC115268100	XP_029731982.1	<i>Aedes albopictus</i>	23,1	23,1	100%	2,6	100,00
	uncharacterized protein LOC5572487 isoform X1	XP_021706930.1	<i>Aedes aegypti</i>	23,1	37,3	100%	2,6	100,00
	uncharacterized protein LOC5572487 isoform X2	XP_021706934.1	<i>Aedes aegypti</i>	23,1	37,3	100%	2,6	100,00
	uncharacterized protein LOC5572487 isoform X3	XP_021706936.1	<i>Aedes aegypti</i>	23,1	37,3	100%	2,6	100,00
IAVICFC	AAEL001389-PA	EAT47524.1	<i>Aedes aegypti</i>	27,8	27,8	100%	0,056	100,00
	palmitoyltransferase app	XP_029735530.1	<i>Aedes albopictus</i>	27,8	27,8	100%	0,056	100,00
	palmitoyltransferase app isoform X1	XP_001653176.2	<i>Aedes aegypti</i>	27,8	27,8	100%	0,056	100,00
	palmitoyltransferase app isoform X2	XP_021699468.1	<i>Aedes aegypti</i>	27,8	27,8	100%	0,056	100,00
	palmitoyltransferase app-like isoform X2	XP_029735470.1	<i>Aedes albopictus</i>	27,8	27,8	100%	0,056	100,00
	uncharacterized protein LOC115270285 isoform X1	XP_029735467.1	<i>Aedes albopictus</i>	27,8	27,8	100%	0,056	100,00
LRSKSKK	uncharacterized protein LOC115260004, partial	XP_029716700.1	<i>Aedes albopictus</i>	23,5	23,5	100%	1,9	100,00
LSKVSRE	Vinculin	XP_001651548.1	<i>Aedes aegypti</i>	24,0	37,3	100%	1,3	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG025117	KXJ70027.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,0	37,3	100%	1,3	100,00
	LOW QUALITY PROTEIN: vinculin-like	XP_029714078.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,0	37,3	100%	1,3	100,00
	vinculin-like	XP_029725849.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,0	37,3	100%	1,3	100,00
MDDEDDD	adenomatous polyposis coli protein-like	XP_021695067.1	<i>Aedes aegypti</i>	28,2	28,2	100%	0,039	100,00
	E3 ubiquitin-protein ligase UBR3	XP_021694801.1	<i>Aedes aegypti</i>	28,2	28,2	100%	0,039	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG011449	KXJ75567.1	<i>Aedes albopictus</i>	28,2	65,5	100%	0,040	100,00
	mRNA turnover protein 4 homolog	XP_019553818.2	<i>Aedes albopictus</i>	28,2	70,2	100%	0,040	100,00
PDATDED	SH3 domain-containing protein C23A1.17-like	XP_029716955.1	<i>Aedes albopictus</i>	25,7	25,7	100%	0,32	100,00
	SH3 domain-containing protein C23A1.17-like	XP_029723166.1	<i>Aedes albopictus</i>	25,7	25,7	100%	0,32	100,00
SHHSDES	AAEL005871-PA	EAT42593.1	<i>Aedes aegypti</i>	25,2	25,2	100%	0,45	100,00
	hypothetical protein RP20_CCG010168	KXJ76195.1	<i>Aedes albopictus</i>	25,2	40,3	100%	0,45	100,00
	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form-like	XP_029725860.1	<i>Aedes albopictus</i>	25,2	25,2	100%	0,45	100,00
SSEKQL	microtubule-associated protein futsch-like isoform X1	XP_029730398.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,4	57,5	100%	0,90	100,00
	microtubule-associated protein futsch-like isoform X2	XP_029730406.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,4	57,5	100%	0,90	100,00

Possível Epítopo	Proteína	Acesso (ID)	Espécie	Score máximo	Score Total	Query cover	Valor E	Porcentagem de Identidade
	microtubule-associated protein futsch-like isoform X3	XP_029730407.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,4	57,5	100%	0,90	100,00
	microtubule-associated protein futsch-like isoform X4	XP_029730408.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,4	57,5	100%	0,90	100,00
	microtubule-associated protein futsch-like isoform X5	XP_029730409.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,4	57,5	100%	0,90	100,00
	microtubule-associated protein futsch-like isoform X6	XP_019563431.2	<i>Aedes albopictus</i>	24,4	57,5	100%	0,90	100,00
	microtubule-associated protein futsch-like isoform X7	XP_029730411.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,4	42,4	100%	0,90	100,00
	microtubule-associated protein futsch-like isoform X8	XP_029730412.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,4	57,5	100%	0,90	100,00
	microtubule-associated protein futsch-like isoform X9	XP_029730413.1	<i>Aedes albopictus</i>	24,4	57,5	100%	0,90	100,00
VAQDLNA	ionotropic receptor 75g precursor	NP_001345804.1	<i>Aedes aegypti</i>	24,4	24,4	100%	0,91	100,00
	probable glutamate receptor	XP_021695736.1	<i>Aedes aegypti</i>	24,4	24,4	100%	0,91	100,00
	uncharacterized protein LOC110680937	XP_021712410.1	<i>Aedes aegypti</i>	24,4	24,4	100%	0,92	100,00

Autoria própria, 2021.

12 APÊNDICE D

Similaridades entre os anticorpos monoclonais encontrados na literatura e as sequências dos epítomos preditos *in silico*.

Anticorpos monoclonais mapeados na literatura (epítomo identificado)	Sequências preditas	
AK1G4 (ITCA) (KAZANECKI <i>et al.</i> , 2007a)	GITCAIP	LGITCAI
	ITCAIPV	LLGITCA
AK2A1 (PVA) (KAZANECKI <i>et al.</i> , 2007a)	AIPVAQD	PVAQDLN
	IPVAQD	YKAIPVA
	KAIPVAQ	
AK2C5 (PATEVFTPVP) (KAZANECKI <i>et al.</i> , 2007a)	ATEVFTP	TEVFTPV
	EVFTPVV	VFTPVVP
	PATEVFT	
AK3D9 E AK7B4 (KFRISHELDSASSEVN) (KAZANECKI <i>et al.</i> , 2007a)	DSASSEV	KFRISHE
	ELDSASS	LDSASSE
	FRISHEL	RISHELD
	HELDSA	SHELDS
	ISHELDS	
AK10F6 (QRSLYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREF) (KAZANECKI <i>et al.</i> , 2007a)	ANDESNE	NDESNEH
	DESNEHS	NEHSDVI
	DSQELSK	QELSKVS
	DVIDSQE	QRSLYKR
	EHSVID	RKANDES
	ELSKVSR	RSLYKRK
	ESNEHSD	SDVIDSQ
	HSDVIDS	SKVSREF
	IDSQELS	SLYKRKA
	KANDES	SNEHSDV
	KRKANDE	SQELSKV
	LSKVSRE	VIDSQEL
	LYKRKAN	YKRKAND
	23C3 (ATWLNPDPSQKQ) (FAN <i>et al.</i> , 2008)	ATWLNPD
TWLNPD		NPDPSQK
LNPDPSP		PDPSQKQ
F8E11 (SSEKQLYNKYP) (FAN <i>et al.</i> , 2008)	EEKQLYN	QLYNKYP
	EKQLYNK	SEEKQLY
	KQLYNKY	SSEKQL
MAB193P (KQLYNKYPDAVATWLNPD) (BISSONNETTE <i>et al.</i> , 2012)	ATWLNPD	PDAVATW
	AVATWLN	QLYNKYP
	DAVATWL	VATWLN
	KYPDAVA	YNKYPDA
	LYNKYPD	YPDAVAT
MAB194P (QETLPSKSNESHDMDDMD) (BISSONNETTE <i>et al.</i> , 2012)	NKYPDAV	
	DHMDDMD	PSKSNES
	ESHDMMD	QETLPSK
	ETLPSKS	SHDMDD
	HDHMDDM	SKSNESH
	KSNESH	SNESHDM
MAB197P (SVVYGLRSKSKKFRRPDI) (BISSONNETTE <i>et al.</i> , 2012)	LPSKSNE	TLPSKSN
	NESHDM	
	GLRSKSK	SKKFRRP
	KFRRPDI	SKSKKFR
	KKFRRPD	SVVYGLR
	KSKKFR	VYGLRSK
hOPN-4/1B20 (RISHELDSASSEVN) (BISSONNETTE <i>et al.</i> , 2012)	LRSKSKK	YGLRSKS
	RSKSKKF	
	DSASSEV	LDSASSE
	ELDSASS	RISHELD
	HELDSAS	SHELDSA
	ISHELDS	

Autoria própria, 2021.