

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Juliana Ramos de Albuquerque Aires Mattoso

**Desenvolvimento de linhagem celular repórter para a
triagem em larga escala de antivirais contra a influenza**

**Recife
2015**

Juliana Ramos de Albuquerque Aires Mattoso

**Desenvolvimento de linhagem celular repórter para a
triagem em larga escala de antivirais contra a influenza**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Laura Helena Vega Gonzales Gil, PhD.

Recife

2015

Juliana Ramos de Albuquerque Aires Mattoso

**Desenvolvimento de linhagem celular repórter para a
triagem em larga escala de antivirais contra a influenza**

Aprovado em 02 / 09 / 2015

Banca Examinadora

**Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

**Dra. Paula Sandrin
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE**

**Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE**

**Dra. Marli Tenório Cordeiro
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

Recife

2015

À minha avó Anita

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Dra. Laura que me recebeu de braços abertos no LaViTe, que mesmo sem eu ter tido nenhuma experiência prévia sobre o assunto ou me conhecer, me deu a oportunidade de ingressar no mestrado e na área de virologia que eu tanto queria. Agradecer pela imensa compreensão que teve comigo durante esses dois anos e meio e pela sempre presente orientação. Agradecer muito à minha grande amiga Laís, que além de ter sido a pessoa que me apresentou à Dra. Laura, foi minha grande companheira de laboratório e sempre companheira na vida. Agradecer a todos os amigos que fiz no lab, e que sempre estiveram dispostos a me ajudar, em especial Vera, Kennya, Amanda, Déborah, Jana, Bruna... vou sentir uma falta enorme de vocês no meu dia-a-dia. Um obrigada enorme para José Valter, que me ensinou tudo que eu sei, desde técnicas até os conceitos mais profundos em virologia, me ajudou nas pequenas dúvidas e nas grandes também, me ajudou quando meus experimentos não davam certo e vibrou comigo quando deram, me ajudou quando eu não podia estar presente, e sempre respondeu minhas mensagens tarde da noite, e se tornou um grande amigo que sentirei saudades. Valter, você é o cara! Agradecer ao meu marido Paulo, meus filhos Pedro e Joaquim, por todo o apoio dado a mim, mesmo que sem perceber, sem vocês não conseguiria. Agradeço aos meus pais e minhas irmãs que me ajudaram todos os momentos, durante as idas tarde da noite ao laboratório, durante as férias das crianças, durante os feriados de trabalho, e com todo amor do mundo. Por fim, agradeço muito à FACEPE pelo financiamento durante o curso.

Resumo

A Influenza é uma doença infecciosa aguda, causada por um vírus pertencente à família *Orthomyxoviridae*. As drogas antivirais e a vacinação são importantes no controle da disseminação da doença, porém alguns vírus adquirem resistência a certas drogas, alertando a necessidade de novas drogas. Triagem de antivirais através de ensaios biológicos são laboriosos e demorados. Com intuito de facilitar a triagem de drogas foram desenvolvidas duas linhagens celulares repórteres distintas. A linhagem Vero-Gluc-NS-Neo é específica para o vírus da influenza, expressa o gene *Gaussia* luciferase na presença do vírus, e foi desenvolvida através da transfecção de células Vero com o plasmídeo pGluc-NS-Neo. A segunda linhagem, denominada de A549-ISRE-Luc-Hygro, foi desenvolvida a partir da transfecção de células A549 com o plasmídeo pISRE-Luc-Hygro, o qual expressa o gene repórter *Firefly* luciferase na presença do interferon do tipo (IFN-I). Seguida da transfecção, ambas linhagens foram selecionadas e submetidas a uma clonagem biológica por diluição limitante e os clones selecionados foram então caracterizados quanto à sua especificidade e sensibilidade no ensaio. Resultados importantes e promissores foram obtidos com a linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro, a qual se mostrou eficiente para a triagem de antivirais para influenza e drogas indutoras do IFN-I. Em relação à linhagem Vero-Gluc-NS-Neo, apesar do plasmídeo construído se mostrar funcional e específico, não foi possível observar a expressão do gene repórter após a infecção viral, trazendo à tona questionamentos e mostrando ser necessária a realização de ensaios complementares.

Palavras-chave: influenza; célula repórter; triagem de antivirais

Abstract

Influenza is an acute infectious disease caused by viruses belonging to the *Orthomyxoviridae* family. Antiviral drugs are vital in controlling the spread of the disease, but some viruses become resistant to certain drugs, prompting the need for new drugs. Antiviral screening through biological tests are laborious and time consuming. In order to facilitate the screening of drugs, it was developed two distinct cell lineages reporters. The Vero-Gluc-Neo-NS cells line is specific for the influenza virus expresses the *Gaussia* luciferase gene in the presence of the virus, and it was developed by transfection of Vero cells with pGluc-NS-Neo plasmid. The second cell line, A549-called ISRE-Luc-Hygro, was developed from the transfection of A549 cells with pISRE-Hygro-Luc plasmid, which expresses the *Firefly* luciferase reporter gene in the presence of type one interferon (IFN-I). Followed by transfection, both cell lines were selected and subjected to a biological cloning by limiting dilution and selected clones were then characterized for specificity and sensitivity in the assay. Important and promising results were obtained with A549-Hygro-ISRE-Luc cells, which proved to be efficient for screening of antiviral drugs for influenza and IFN-I inducing drugs. Regarding the Vero-Gluc-NS-Neo cell line, despite the plasmid constructed to show functional and specific, it was not possible to observe the reporter gene expression after viral infection, bringing up questions and shown to be necessary to carry out further testing.

Key words: influenza; reporter cell line; antiviral screening.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Estrutura do vírus da Influenza. Fonte: Urbaniak et al.(2012)	5
Figura 2 - Região promotora do seguimento viral formada através de complementariedade de bases. <i>Corkscrew e panhandle</i>	6
Figura 3 - Ciclo de replicação viral (ilustração). Fonte: Itzstein (2007). Adaptada pela autora	10
Figura 4 - Ilustração representando a resposta imunológica às infecções provocadas por vírus. Fonte: Abbas AK, Lichtman AH. <i>Cellular and Molecular Immunology</i> , (2003), adaptado pela autora.	12
Figura 5 - Plasmídeo pGluc-NS, codificando o gene repórter da <i>Gaussia</i> luciferase. Fonte: Da autora, construído através do Programa ApE 1.1.0.1	19
Figura 6 – Plasmídeo pGluc-NS-Neo, codificando o gene repórter da <i>Gaussia</i> luciferase entre as regiões não traduzidas do segmento NS do vírus influenza A, e o gene de resistência neomicina fosfotransferase.Fonte: Da autora, construído através do Programa ApE 1.1.0.1	20
Figura 7 - Plasmídeo pISRE-Luc-Hygro, codificando o gene repórter da <i>Firefly luciferase</i> dirigido pelo promotor ISRE, e o gene de resistência à hygromicina. Fonte: Da autora, construído através do Programa ApE 1.1.0.1	20
Figura 8 - Expressão da <i>Gaussia</i> luciferase 24 horas após a transfecção. <i>Relative light units</i> (RLU).	29
Figura 9 - Leitura da expressão do gene Fluc pelos clones #10, #11, #14 e #17 após 24 horas de estímulo com IFN- α (1000 UI/mL).	30
Figura 10 - Leitura da expressão do gene Fluc pelos clones #10 e #14 após o estímulo com IFN- α (1000 UI/mL).	31

Figura 11 - Expressão da luciferase em RLU após 6 horas de estímulo com o IFN- α em diferentes concentrações.	32
Figura 12 - Expressão da luciferase da linhagem celular A549-ISRE-Luc-Hygro após 6 horas de estímulo com o IFN- α em diferentes concentrações .	32
Figura 13 - Atividade da luciferase na linhagem celular A549-ISRE-Luc-Hygro após 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h e 24h de estímulo com Poly I:C (1 μ g/mL).	33
Figura 14 - Atividade da luciferase na linhagem celular A549-ISRE-Luc-Hygro após 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h e 24h de estímulo com Poly I:C (1 μ g/mL).	34
Figura 15 - Expressão da <i>Firefly</i> luciferase em RLU após 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de infecção com vírus PR8-HA-N117D. Como controle positivo do ensaio foi utilizado Poly I:C e IFN- α . Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura DMEM.	35
Figura 16 – Microscopia de fluorescência. A- controle positivo interno: célula Vero-Gluc-NS-Neo transfectada com vRNP e RW-RFP. B- controle negativo: célula Vero-Gluc-NS-Neo transfectada com pJG-HW2000-2013-PA, -PB2 e – NP.	36

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

α	alfa
β	beta
%	por cento
μg	micrograma
AMP	adenosina monofosfato
APC	célula apresentadora de antígeno
ATP	adenosina trifosfato
BSA	bovine serum albumin
CO_2	dióxido de carbon
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
GLuc	<i>Gaussia</i> luciferase
HÁ	hemaglutinina
HA1	hemaglutinina 1
HA2	hemaglutinina 2
IAV	Influenza A virus
IFN	Interferon
IFN-I	interferon tipo 1
ISG	<i>interferon-stimulated genes</i>
ISRE	interferon stimulated response element
Kb	Kilobases
LB	Luria-Bertani
M1	matriz 1
M2	matriz 2
MDCK	<i>Madin Darbin Kidney</i>
MHC I	<i>molecular histocompatibility complex I</i>
MHC II	molecular histocompatibility complex II
mL	mililitro
mM	Milimolar
MOI	multiplicity of infection
NA	neuraminidase
NK	natural killer
NLSs	nuclear location signs
Nm	Nanomolar
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain receptors</i>
NP	nucleocapsídeo
NS	non-structural

O ₂	oxigênio
p.i.	pós infecção
PA	polimerase ácida
PAMP	pathogens associated molecular pattern
Pb	pares de bases
PB1	polimerase básica 1
PB2	polimerase básica 2
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polimerase chain reaction
pMol	picomol
POLY I:C	Poliinosínico: ácido policitidílico
PR8	Puerto Rico 8
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
RFP	Red fluorescent protein
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RLU	relative lights unit
RNA	ácido ribonucleico
RNAc	ácido ribonucleico complementar
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RNAv	ácido ribonucleico viral
RNP	<i>riobonucleoproteico</i>
TNF-α	tumor necrosis factor
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
UI	unidade internacional
UTRs	<i>untranslated regions</i>
vRNP	complexo ribonucleoproteico viral

Sumário

Resumo	v
Abstract	vi
Lista de ilustrações	vii
Lista de abreviaturas, sigas e símbolos	ix
1 Introdução	1
2 Revisão da Literatura	3
2.1 Influenza A	3
2.1.1 Histórico	3
2.1.2 O vírus	4
2.1.2.1 Classificação	4
2.1.2.2 Estrutura	5
2.1.2.3 Ciclo de replicação viral	7
2.1.3 Resposta imunológica ao vírus influenza	10
2.2 Antivirais	12
2.3 Linhagem celular repórter	13
3 Objetivos	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
4 Material e Métodos	16

4.1 Cultivo celular	16
4.2 Cultivo de vírus Influenza A/Puerto Rico/1934/H1N1/HÁ-N117D	17
4.3 Construção do plasmídeo pGluc-NS-Neo e pISRE-Luc-Hygro	17
4.4 Avaliação de eficiência do plasmídeo pGluc-NS-Neo	21
4.5 Teste citotoxicidade da geneticina	21
4.6 Teste citotoxicidade da Hygromicina	22
4.7 Transfecção da célula Vero com o pGluc-NS-Neo	22
4.8 Transfecção da célula A549 com o pISRE-Luc-Hygro	23
4.9 Clonagem biológica por diluição limitante	23
4.10 Caracterização da linhagem Vero- pGluc-NS-Neo	24
4.11 Caracterização da linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro	24
4.12 Infecção da linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro com o vírus Influenza A/Puerto Rico/1934/H1N1/HÁ-N117D	25
4.13 Transfecção da linhagem Vero-Gluc-NS-Neo com o complexo vRNP	26
5 Resultados	27
5.1 Construção do plasmídeo pGluc-NS-Neo	27
5.2 Teste de citotoxicidade da geneticina e hygromicina	27
5.3 Análise da expressão do gene repórter do plasmídeo	28

pGluc-NS-Neo

5.4 Transfecção das células com os plasmídeos pGluc-NS-Neo e pISRE-Luc-Hygro e clonagem biológica por diluição limitante	29
5.5 Caracterização da linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro	29
5.6 Infecção da linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro com o vírus Influenza A/Puerto Rico/1934/H1N1/HÁ-N117D	34
5.7 Infecção da linhagem Vero-Gluc-NS-Neo com o vírus vírus Influenza A/Puerto Rico/1934/H1N1/HA-N117D	35
5.8 Transfecção da linhagem Vero-Gluc-NS-Neo com o complexo vRNP	36
6 Discussão	36
7 Conclusões	43
8 Referências	44

1 Introdução

A influenza A é uma doença infecciosa aguda causada pelo vírus influenza A (*Influenza A vírus* - IAV), o qual possui o genoma composto por oito segmentos de fitas simples de RNA no sentido negativo e pertence à família *Orthomyxoviridae*. Além de acometer grande parte da população mundial, o IAV é responsável por várias pandemias e epidemias ao longo dos anos, podendo trazer sérias complicações ao paciente, principalmente quando este se encontra imunologicamente debilitado, possui idade avançada ou é menor de 5 anos de idade. O método mais eficaz contra a doença é a vacinação, porém a alta mutabilidade do vírus faz com que seja necessária a fabricação de uma nova vacina a cada ano, o que leva tempo e traz implicações econômicas.

Os antivirais possuem uma grande importância no tratamento dos pacientes e controle da disseminação da influenza e, apesar dos antivirais disponíveis atualmente serem eficazes contra a doença, a maioria dos vírus isolados possui resistência associada aos medicamentos. Com isso, novos antivirais são necessários para a influenza, inclusive o desenvolvimento de novos métodos de triagem que sejam mais rápidos e sensíveis.

No presente estudo foram desenvolvidas duas linhagens celulares repórteres para serem utilizadas na investigação da virologia molecular e na triagem de antivirais contra o vírus da influenza. A linhagem Vero-Gluc-NS-Neo é específica para o vírus influenza A, a qual foi obtida através da transfecção de células Vero com o plasmídeo pGluc-NS-Neo. O plasmídeo construído possui o gene repórter da *Gaussia* luciferase (GLuc) clonado entre as regiões não traduzidas do segmento NS do vírus influenza A, região esta conhecida por possuir a função de promotor para a enzima RNA polimerase viral. A principal estratégia do sistema é o fato do gene

GLuc estar clonado no sentido inverso, o que faz com que o RNAm sintetizado na célula a partir desta sequência necessite da presença do vírus para ser traduzido em proteína. Com isso, apenas quando a linhagem celular se encontra infectada pelo vírus a proteína GLuc é traduzida e sua atividade pode ser mensurada através de sua capacidade luminescente.

A segunda linhagem, denominada de A549-ISRE-Luc-Hygro, foi desenvolvida a partir da transfecção de células A549 com o plasmídeo pISRE-Luc-Hygro, o qual expressa o gene repórter *Firefly* luciferase na presença do interferon do tipo I (IFN-I).

Resultados importantes foram obtidos utilizando o pGluc-NS-Neo, mostrando a eficiência e sensibilidade do sistema construído. Porém, não foi possível observar expressão do gene repórter quando a linhagem celular foi infectada com o vírus da influenza, trazendo questionamentos e formulação de hipóteses interessantes ao estudo do vírus e levando à conclusão da necessidade de experimentos complementares para tornar possível a utilização da linhagem Vero-Gluc-NS-Neo como ferramenta de triagem para antivirais.

A linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro, por sua vez, se mostrou um método valioso para a triagem de drogas indutoras de IFN-I, bem como para antivirais capazes de inibir a replicação de vírus indutores dessa citocina, como é o caso do IAV.

2. Revisão da literatura

A Influenza é uma infecção de origem viral, extremamente contagiosa e de importância mundial (Abrams *et al.*, 2003). Seus sintomas variam de brandos até síndromes respiratórias variadas atingindo os pulmões, brônquios, garganta e podendo ser associada com infecções bacterianas secundárias, levando o paciente a contrair pneumonia e trazendo sérias complicações à saúde (Zambon *et al.*, 2003). Além disso, o curso da infecção pode ser afetado por vários fatores como a idade do paciente, grau de imunidade pré-existente, propriedades do vírus, fumo, comorbidades, imunossupressão e gravidez.

2.1 Histórico

Em torno do ano de 1300, acreditava-se que a influenza era causada por “influência das estrelas”, dando origem ao termo “influenza”, derivado do italiano *influentia* (Ghendon, 1994). Apenas no ano de 1931 surgiu o indício que o agente causador da doença seria um vírus, através dos estudos de Richard Shope, que demonstrou que a influenza suína poderia ser transmitida através de muco filtrado (Shope, 1931). Em 1933, o vírus da influenza foi finalmente isolado e descrito por Smith e colaboradores. Apesar do isolamento viral ter sido realizado somente durante o século XX, a primeira descrição de uma infecção por influenza foi publicada em 1580 e, desde então, vários surtos pandêmicos foram registrados ao longo dos anos (Zambon *et al.*, 2003; Kilbourne, 2006). Pelo menos quatro pandemias ocorreram no século XIX, três durante o século XX, sendo a mais grave delas a gripe espanhola (1918-1919) causada pelo H1N1, responsável pela morte de, aproximadamente, 50 milhões de pessoas (Tumpey *et al.*, 2005; Frost *et al.*, 1920). No século XXI, a primeira pandemia ocorreu entre os anos de 2009 e 2010,

causada pelo vírus H1N1 de origem suína, originada no México, e rapidamente se espalhou pelo mundo sendo reportados mais de 180.000 casos de pessoas infectadas em 207 países diferentes (Steel, 2010). As pandemias são consequências de trocas antigênicas sofridas pelos vírus, o que acarreta a introdução de novos vírus na população que ainda se encontra imunologicamente susceptível a esse novo subtipo viral e, desta forma, a infecção rapidamente se espalha ocasionando altos índices de morbidade e mortalidade (Johnson *et al.*, 2002).

2.2 Classificação Viral

O vírus Influenza A pertence a ordem *Mononegavirales* e à família *Orthomyxoviridae*, a qual é composta por cinco gêneros distintos, o *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Isavirus*, *Thogotovirus*, sendo o Influenza A o responsável por infectar a maior diversidade de hospedeiros e ocasionar as pandemias de influenza (Flores *et al.*, 2007). Os três gêneros diferentes do vírus Influenza são classificados baseados em suas diferenças antigênicas (variabilidade das glicoproteínas de membrana), além de diferirem na morfologia e organização genômica. O Influenza A é o mais comum, atinge humanos e animais e é capaz de provocar a forma mais grave da doença em pessoas pertencentes a qualquer faixa etária. O Influenza B afeta exclusivamente humanos, principalmente crianças, levando-as a contrair uma forma mais branda da doença, além disso, por ser um vírus menos mutagênico, possui uma estabilidade imunológica importante. O subtipo C é raramente encontrado, provavelmente devido aos seus sintomas muitas vezes sub-clínicos (Fields, 2001).

2.3 Estrutura

O IAV é um vírus de RNA fita simples com polaridade negativa e envelopado (Figura 1). Possui morfologia esférica ou pleomórfica e diâmetro entre 80 e 120nm (Flores *et al.*, 2007).

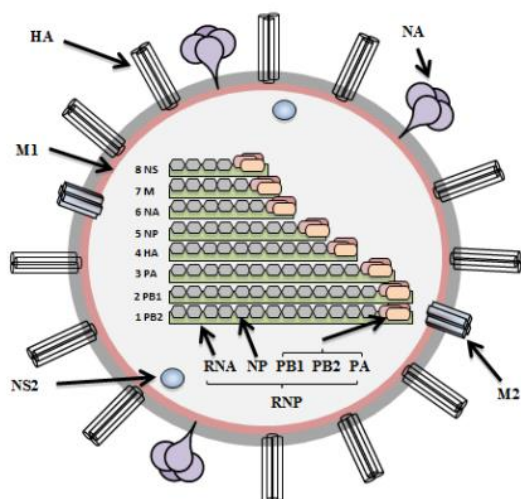


Figura 1 - Estrutura do vírus da Influenza. Fonte: Urbaniak *et al.* (2012)

O IAV possui um genoma segmentado em 8 partes que, juntas, codificam cerca de 16 proteínas diferentes, onde 10 destas são bem conhecidas e seis descobertas posteriormente (Jagger *et al.*, 2012; Wise *et al.*, 2009; 2012). Todos os segmentos possuem um gene (ou mais) na região central, flanqueada por sequências altamente conservadas nas extremidades 3' e 5' (*untranslated regions* UTRs) (Dai *et al.*, 2014). Essas regiões apresentam complementariedade, e, através do pareamento de bases, formam conformações específicas conhecidas como *panhandle* ou *corkscrew* (Figura 2), constituindo as regiões promotoras para a síntese de RNA viral (Flores *et al.*, 2007).

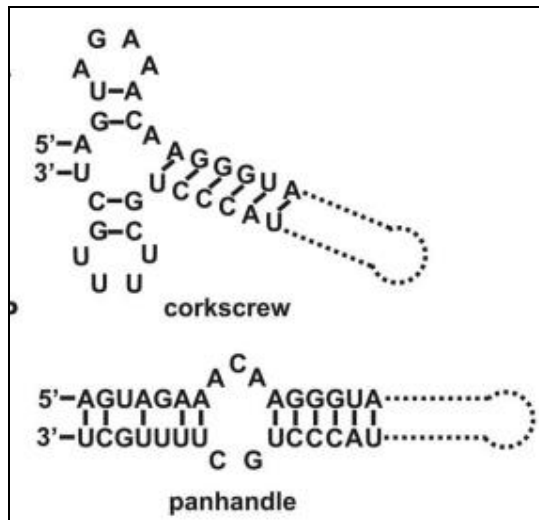


Figura 2 - Região promotora do seguimento viral formada através de complementariedade de bases.

Corkscrew e panhandle. Fonte: Widjaja et al.(2012)

O IAV possui em sua estrutura uma bicamada lipídica formada pela membrana plasmática, proveniente da célula hospedeira a qual ele infectou anteriormente, e nela estão presentes as glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). A hemaglutinina é a maior glicoproteína do envelope viral formada por uma cadeia peptídica de 560 aminoácidos, além de ser responsável pela antigenicidade viral, a HA também possui função crucial durante a entrada do vírus na célula hospedeira, sendo muitas vezes estudada como alvo para drogas antivirais (Fields, 2007; Flores, 2007; Hsu, 2007;). A NA, por sua vez, encontra-se envolvida na liberação das partículas virais recém-formadas da célula hospedeira. Atualmente, existem descritos na literatura 18 tipos de HA e 11 NA diferentes presentes nos subtipos de vírus circulantes na natureza e são em suas sequências gênicas que ocorrem as mutações e rearranjos genômicos responsáveis

a) Entrada do vírus na célula hospedeira

Primeiramente, a infecção se inicia com a ligação da glicoproteína do envelope viral, a HA, às moléculas de ácido siálico presentes na membrana celular do hospedeiro, seguido por endocitose do vírus (Samji, 2009). O baixo pH dentro dos compartimentos endocíticos provocam uma mudança na estrutura da proteína de superfície viral, a HA, fazendo com que esta se torne susceptível à ação de proteases, e, conseqüentemente, ocorrendo a clivagem da HA em HA1 e HA2. Dessa forma, a subunidade de HA interage com a membrana endocítica, ocasionando a fusão entre as duas (Simith et al., 2004). O ambiente ácido do endossomo também é importante ao ocasionar a abertura do canal iônico viral M2, acidificando o core viral, resultado na liberação dos vRNPs de M1 e, assim, deixando livre o material genético viral, juntamente com suas proteínas, no citoplasma celular (Fodor, 2013; Szewczyk et al., 2014).

b) Entrada do vRNP no núcleo celular

Uma vez no citoplasma, o complexo vRNP é transportado para o núcleo, onde ocorrerá a transcrição e replicação viral. Todas as proteínas virais que compõem o complexo RNP possuem em sua estrutura sinais de localização nuclear (*nuclear location signs* - NLSs), os quais são reconhecidos pela maquinaria de importação nuclear da célula hospedeira (Samji, 2009).

c) Transcrição e replicação do genoma viral

Como o genoma do vírus Influenza A possui sentido negativo, ele replica o seu material genômico através da síntese de moléculas de RNA fita simples com polaridade positiva, chamadas de RNA complementar (RNAc), que, por sua vez,

funcionam como molde para a síntese de mais RNAv (-). Para a realização da transcrição, a RNA polimerase viral dependente de RNA utiliza o RNAv (-) genômico como molde para a produção do RNAm, que possui calda poli adenilada na região 3' e CAP na 5' (proveniente do RNAm da célula infectada), que então será exportado para o citoplasma onde será traduzido pela maquinaria celular hospedeira levando à síntese das proteínas virais (Flores et al., 2008; Widjaja *et al.*, 2012).

A síntese das proteínas virais que compõem o envelope, a HA, NA e M1 é iniciada no citosol e continua no retículo endoplasmático celular, onde irão ser glicosiladas e agrupadas em trímeros e tetrâmeros (Shaw, 2007). Em seguida, as proteínas passarão pelo complexo de Golgi, onde receberão as modificações necessárias até alcançarem a superfície celular (Hay, 1992).

d) Exportação do vRNP do núcleo celular

Através da interação com as proteínas M1 e NS2, os complexos RNP são exportados de volta para o citoplasma, onde ocorrerá a formação de novas partículas virais e sua consequente liberação para o meio extracelular. (Chen *et al.*, 2012; Ozawa *et al.*, 2013).

e) Montagem e liberação das partículas virais

O vírus Influenza é envelopado e necessita da membrana celular hospedeira para formar as partículas virais e conseguir sair para infectar outras células (Nayak *et al.*, 2009). Atualmente, são hipotetizados dois modelos diferentes para explicar como ocorre o empacotamento dos segmentos do genoma viral: o modelo de empacotamento aleatório e o específico, sendo o segundo o mais aceito por já terem

sido localizados sinais de empacotamento nas regiões traduzidas e 3' e 5' UTR e de alguns seguimentos do genoma viral (Kawaoka *et al.*, 2003).

No caso de ocorrer uma co-infecção da célula do hospedeiro com dois vírus influenza diferentes, pode ocorrer uma mistura de segmentos durante a montagem das partículas virais e, dessa maneira, acarretar o surgimento de novos vírus, os quais irão possuir um grande potencial pandêmico (Fields, 2001).

Após a ligação dos vRNPs a M1 e NS e, em seguida, às glicoproteínas de membrana HA, NA e M1, que já se encontram ancoradas na superfície celular, conseqüentemente ocorre o brotamento das partículas recém-formadas (Samjii, 2009), que continuam presas à célula hospedeira até a NA realizar a clivagem dos resíduos de ácido siálico liberando-as para infectar novas células (Noda *et al.*, 2006).

2.5 Resposta imunológica ao vírus Influenza

O vírus Influenza A é imunogênico e, por isso, é alvo das respostas imunológicas produzidas pelos linfócitos e anticorpos protetores, sendo capazes de induzirem essas respostas mesmo se encontrando inativados (Reis e Souza *et al.*, 2004).

Para que possa se estabelecer a infecção com conseqüentemente desenvolvimento da doença, o vírus da Influenza deve, primeiramente, ultrapassar as barreiras do sistema imunológico inato e sobreviver às respostas que são rapidamente ativadas durante o curso da infecção (Randal *et al.*, 2015). A família do interferon e as citocinas antivirais possuem um papel importante e crítico na restrição

dos primeiros estágios da infecção viral, além de serem responsáveis pela ativação do sistema imune adaptativo (Reis e Souza *et al.*, 2004).

Receptores reconhecedores de padrões (*pattern recognition receptors* - PRRs) são receptores expressos pelas células que detectam rapidamente a invasão de patógenos através do reconhecimento de estruturas bem conservadas chamadas de padrões moleculares associados à patógenos (*pathogens associated molecular pattern* - PAMPs). Subsequentemente, os PRRs ativam vias de sinalização intracelular, levando às diversas respostas imunológicas (Sato *et al.*, 2012).

O reconhecimento do vírus da Influenza pelo sistema imune inato é realizado por receptores de três classes diferentes de PRRs: os receptores semelhantes a Toll (*Toll-like receptors* - TLR 3, TLR 7 e TLR 8), o *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), e os pertencentes à família semelhante a NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain receptors*) (Iwasaki e Pillai, 2014), com consequente produção de IFN do tipo 1 (IFN-I), o IFN- α e IFN- β .

O IFN-I se liga ao seu receptor específico na membrana e um sinal é rapidamente transmitido para o meio intracelular. A primeira cascata de sinais produzida pelo IFN-I é mediada pela via JAK1-STAT e, subsequentemente, leva à ativação do complexo de transcrição do fator regulatório estimulado por interferon (ISG), o qual induz a expressão de diversos genes que, juntos, levarão a célula ao chamado estado antiviral, que irá limitar a replicação do vírus e sua disseminação. (Sato *et al.*, 2012; Randall *et al.*, 2015). Além disso, o IFN-I recruta monócitos/macrófagos, células *natural killer* (NK) e linfócitos T citotóxicos. Os monócitos/macrófagos quando infectados com o IAV rapidamente induzem mecanismos efetores antivirais e esses mecanismos incluem a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis*

fator - TNF- α) e as interleucinas 1 β e 6 (IL- β e IL-6) (Kaufmann *et al.*, 2001). Por fim, o IFN-I irá estimular a maturação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e elevar a expressão do complexo de histocompatibilidade de classe I e classe II (MHC I e MHC II), resultando em um aumento na apresentação de antígenos e, dessa forma, facilitando os mecanismos efetores da resposta imune adaptativa ao vírus (Trapani *et al.*, 1993; Durbin *et al.*, 2000; Diebold *et al.*, 2004;) (Figura 4).

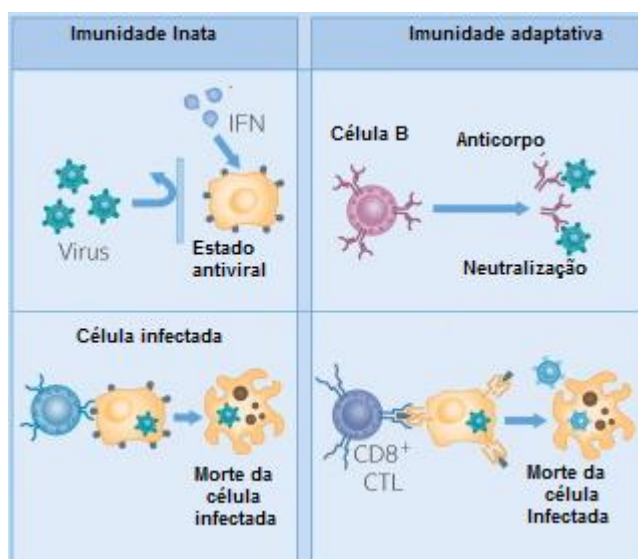


Figura 4 - Ilustração representando a resposta imunológica às infecções provocadas por vírus. Fonte: Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*, (2003), adaptado pela autora.

2.6 Antivirais

Atualmente, dois grupos de antivirais são utilizados para o tratamento da Influenza: inibidores de canal iônico M2, conhecidos como adamantanes (amantadina e rimantadina) e, os mais recentes, os inibidores de neuraminidase (oseltamivir e zanamivir) (Hsieh e Hsu, 2007). Os adamantanes possuem

desvantagens por serem eficazes apenas quando administrados na fase inicial da doença, além da maioria dos vírus circulantes apresentarem resistência tanto à amantadina quanto à rimantadina (Barik *et al.*, 2012). Vírus da Influenza A mutantes, resistentes ao oseltamivir e ao zanamivir, também têm sido encontrados em culturas celulares e isolados de pacientes (Krawitz *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2012).

Os métodos disponíveis atualmente para a triagem de novos antivirais são laboriosos e demorados, baseados principalmente em ensaios de placa e observação de efeitos citopáticos. Com isso, a procura por novos antivirais através de um método rápido e eficiente se faz necessária (Barik *et al.*, 2012). Dentre várias moléculas estudadas para o tratamento da Influenza, os compostos naturais têm sido estudados principalmente por conta de seus efeitos imunomodulatórios e antivirais (He *et al.*, 2011; Haruyama *et al.*, 2012), como é o caso do trabalho desenvolvido por Lei Wan e colaboradores publicado em 2015, em que foi avaliado o efeito de 300 compostos naturais diferentes sobre a replicação do vírus Influenza A e foi possível constatar que o composto *Polygonum cuspidatum* e seus componentes ativos atenuaram significativamente a replicação do vírus Influenza, *in vitro*, em células de pulmão.

Além de tudo, os compostos extraídos da natureza foram utilizados durante séculos e continuam a ser utilizados principalmente em países em desenvolvimento, onde a medicina é limitada de acordo com a viabilidade e custo associados aos medicamentos (Lupfer *et al.*, 2010). Dessa forma, extratos naturais podem ser potenciais fontes de agentes antivirais contra o Influenza, atraindo a atenção de muitos pesquisadores.

2.7 Linhagem celular repórter

Estudos têm sido realizados com o intuito de se desenvolver um novo método mais rápido e eficaz para a triagem de antivirais (Zhang *et al.*, 2011; Atkins *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2012;). Dentre esses, o desenvolvimento e uso de uma linhagem celular para a triagem de drogas possui vantagens importantes por eliminarem agentes citotóxicos, impermeáveis à membrana ou aqueles que são inativos intracelularmente dentre uma grande variedade de compostos a serem testados (Ozawa *et al.*, 2013). A utilização das células repórteres permite explorar a especificidade dos fatores de transcrição virais pelos seus promotores e atrelar isso à extrema especificidade das enzimas repórteres, além do que, o fato do ensaio utilizar células, possibilita o acesso à compostos que tenham como alvo qualquer estágio de replicação e desenvolvimento do vírus, inclusive a entrada do vírus na célula e sua consequente endocitose (Hossain *et al.*, 2010).

Genes repórteres tem atraído cada vez mais o interesse de muitos pesquisadores por sua capacidade de fornecer meios valiosos para o acompanhamento de diferentes processos biológicos (Badr, 2011; Tannous, 2011). Podem ser definidos como genes com fenótipos facilmente mensuráveis e geralmente são selecionados com base na sensibilidade, na dinâmica e confiança do ensaio (Alam e Cook, 1990).

Linhagens celulares repórteres têm sido desenvolvidas para o estudo do vírus da influenza utilizando genes repórteres como *Firefly* luciferase (FLuc) (Hossain *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011 ;) e *Green fluorescent protein* (GFP) (Ozawa *et al.*, 2013), porém ainda existem poucos estudos que utilizam o gene repórter da *Gaussia luciferase* (GLuc) (Zhu *et al.*, 2011; Widjaja *et al.*, 2012). Em 2012, Zhang e colaboradores, desenvolveram um sistema de célula repórter

baseado em células HeLa, específico para o vírus da influenza A, portando o gene da *Firefly luciferase*. Utilizando a linhagem produzida, realizaram a triagem de diversos compostos identificando possíveis antivirais e demonstrando a sensibilidade do ensaio. Pesquisas utilizando FLuc e GLuc também tem sido realizadas com outros vírus, como o Ebola e o vírus Marburg (Uebelhoer *et al.*, 2014), em que foram desenvolvidos métodos eficientes para o auxílio na pesquisa de antivirais bem como na pesquisa básica sobre o ciclo de replicação dos vírus.

Bioluminescência é a capacidade que alguns organismos vivos possuem em produzir luz e essa característica é desejada por muitos pesquisadores quando se trata de genes repórteres. Um dos mais importantes dentre os genes repórteres bioluminescentes é o *Firefly luciferase*, que produz luz através da reação que converte luciferina e adenosina trifosfato (ATP) em oxy-luciferina, adenosina monofosfato (AMP) e luz, na presença de oxigênio (O₂), porém, para que seja possível a avaliação da expressão do gene e consequente atividade da enzima, faz-se necessária a lise celular (Zhang *et al.*, 2011).

O gene repórter da *Gaussia luciferase*, extraído da *Gaussia princeps*, cataliza a oxidação de pequenas moléculas de coelenterazina para produzir luz e, ao contrário do sistema *Firefly luciferase*, não necessita de ATP para sua atividade (Badr e Tannous, 2011). Por ser naturalmente secretado em mamíferos, o nível de Gluc no sangue ou na urina pode ser usado como um marcador para monitorar diferentes eventos biológicos *in vivo*, tais como o crescimento e resposta de tumores à terapia, infecção e replicação viral, bem como a viabilidade de células circulantes (Wurdinger *et al.*, 2008). Em cultura, os níveis de Gluc no meio mantém uma relação linear com o respectivo número de células, crescimento e proliferação, e repórteres secretados podem ser quantificados sem a necessidade de lise celular deixando as

células intactas e disponíveis para outras análises (Tannous, 2009). A Gluc é aproximadamente 2000 vezes mais sensível em relação ao *Firefly* e *Renilla reniformis* luciferases, além de ser uma proteína termoestável (Zhu *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver duas linhagens celulares repórteres para serem utilizadas na virologia molecular e na triagem de antivirais contra do vírus da influenza

3.2 Objetivos Específicos

1. Construção do plasmídeo pGluc-NS-Neo;
2. Desenvolvimento e caracterização da linhagem celular repórter, Vero-Gluc-NS-Neo, para a triagem de antivirais contra o vírus Influenza A;
3. Desenvolvimento e caracterização da linhagem celular repórter A549-ISRE-Luc-Hygro para a triagem de drogas antivirais e indutoras de IFN-I.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo celular

Células Vero e A549 foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de 2 mM L-

glutamina (Invitrogen) e 1% de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina, Gibco) em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

4.2 Cultivo do Vírus Influenza A/Puerto Rico/1934/H1N1/HA-N117D

O vírus da Influenza A/Puerto Rico/1934/H1N1/HA-N117D foi amplificado em células Vero mantidas em meio DMEM, 2% de *Bovine Serum Albumin* (BSA), suplementado com antibióticos (1% de Penicilina e Streptomicina), 1% de l-glutamina (2mM), 2,5% de HEPES *buffer* (25 mM) e TPCK-tripsina (2 µg/mL). Depois de 3 a 4 dias de crescimento, foi observado o efeito citopático e o sobrenadante contendo as partículas virais congelado a -80 °C. Esse vírus foi construído no departamento de virologia e possui uma mutação no aminoácido de posição 117 da proteína HA, o qual resulta em uma melhor replicação em células Vero (Gil e Silva Jr. dados não publicados; Murakami *et al.*, 2011). Para a realização da titulação viral, células Vero foram semeadas em placas de seis poços (4×10^5 células/poço) e após 24 horas foram infectadas com diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-12}) do vírus Influenza A/Puerto Rico/1934/H1N1/HA-N117D. Após uma hora de adsorção a 37 °C, o inóculo foi removido e as células foram cobertas com meio semissólido, DMEM/0,2% de BSA, contendo 1% de agarose, antibióticos (1% de Penicilina e Streptomicina), 1% de l-glutamina (2 mM), 2,5% de HEPES *buffer* (25mM) e TPCK-tripsina (1 µg/ml) e posteriormente incubadas a 37 °C. Após quatro dias, as células foram então fixadas em formalina 10% e coradas com cristal de violeta 0, 05% para a revelação do efeito citopático viral, contagem das placas e determinação do título viral.

4.3 Construção do plasmídeo pGLuc-NS-Neo e pISRE-Luc-Hygro

Na construção da linhagem celular foi utilizado o plasmídeo pGLuc-NS(WF10) (Figura 5) (gentilmente cedido pelo Dr. Daniel Roberto Perez, Universidade de Maryland, E.U.A), que contém o gene repórter *Gaussia luciferase* clonado no sentido inverso entre as regiões não traduzidas do gene NS do vírus da influenza (região promotora para a replicação e transcrição do genoma do influenza).

O plasmídeo pGluc-NS foi primeiramente digerido utilizando as enzimas de restrição Sac I (*Streptomyces achromogenes*) e Ssp I (*Sphaerotilus species*). Para tal, foram inseridos em um tubo *ependorf*, 1 µL da enzima Sac I (20.000 U), 4 µL da Ssp I (5.000 U), 2 µg do pGluc-NS, 2 µl do tampão NEB2, e 11,3 µl de água ultra-pura. Em seguida, o tubo contendo o mix acima foi colocado em termobloco durante 4 horas a uma temperatura de 37 °C seguido de um período de 20 minutos, a 65 °C para inativação das enzimas. Concomitantemente, o plasmídeo vetor pcDNA3.1 contendo o gene da neomicina fosfotransferase foi digerido utilizando as enzimas de restrição NrU I (*Noacardia rubra*) e Sac I. Os produtos das digestões realizadas foram então ligados utilizando a enzima DNA ligase. O plasmídeo pGLuc-NS-Neo (Figura 6) construído foi então transfectado através de eletroporação em *E. coli* cepa DH10B (Invitrogen). As condições de eletroporação para o eletroporador ECM-830 (BTX Harvard *Apparatus*) foram: cuvetas de 1mm, 2.750 volts, 99µs, 5 pulsos com intervalo de 1 segundo., para 50 µL de célula com eficiência de 10⁹ células/µg de DNA. Seguida à eletroporação, as bactérias foram distribuídas em placas com meio Lúria Bertani (LB) com 50 mg/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C durante 18-20 horas. Colônias foram crescidas em 10 mL de meio LB com 50 mg/mL de ampicilina a 37 °C, 150 rpm, durante 18 horas. Essas células foram inoculadas em 500 mL de meio LB com o antibiótico de seleção e incubadas a 37 °C por 16-20 horas. Posteriormente, as células foram concentradas por centrifugação (3500 rpm por 10

minutos) e o DNA plasmideal extraído utilizando-se o kit *Plasmid Midi* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

A PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada de oito das colônias crescidas para confirmação dos clones obtidos utilizando os primers Gluc-F e Gluc-R. Para tal, foram introduzidos em um tubo *ependorf* 10 μ L do tampão 2X, 5 pmol do *primer forward*, 5 pmol do *primer reverse*, 0.3 μ L da enzima Taq polimerase, e uma pequena amostra da colônia crescida. A reação foi completada para o volume final de 20 μ L através da adição de água ultra-pura. As condições da PCR foram: 5 minutos a 94 °C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos, cada um composto por 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 55 °C, e 1 minuto de extensão a 72 °C, com 20 minutos de extensão final a 72 °C. O plasmídeo pISRE-Luc-Hygro (Figura 7) se encontrava previamente construído pela Dra. Laura Gil e estocado no Departamento de Virologia.

Figura 5 - Plasmídeo pGluc-NS, codificando o gene repórter da *Gaussia* luciferase. Fonte: Da autora, construído através do Programa ApE 1.1.0.1.

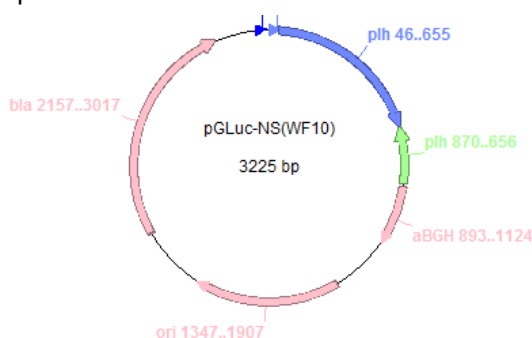


Figura 6 – Plasmídeo pGluc-NS-Neo, codificando o gene repórter da *Gaussia* luciferase entre as regiões não traduzidas do segmento NS do vírus influenza A, e o gene de resistência neomicina fosfotransferase. Fonte: Da autora, construído através do Programa ApE 1.1.0.1

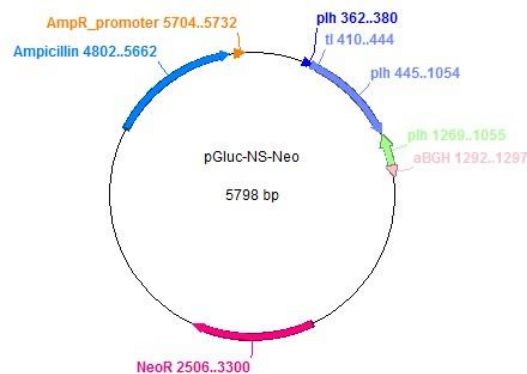
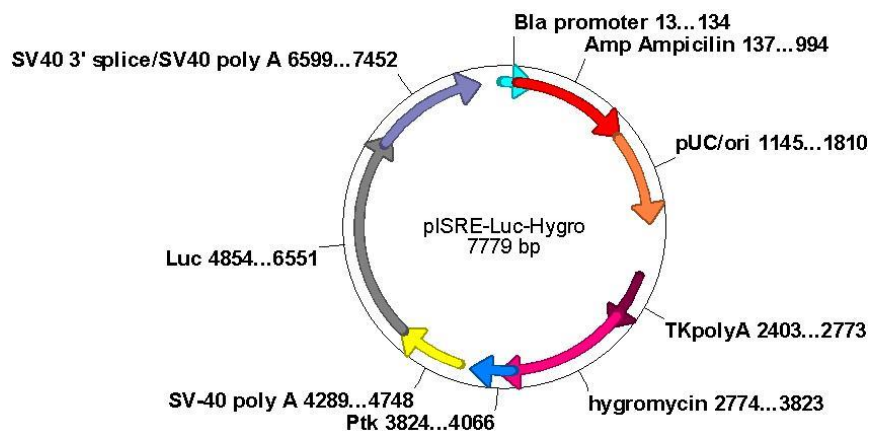


Figura 7 - Plasmídeo pISRE-Luc-Hygro, codificando o gene repórter da *Firefly luciferase* dirigido pelo promotor ISRE, e o gene de resistência à hygromicina. Fonte: Da autora, construído através do Proograma AoE 1.1.0.1



4.4 Avaliação da eficiência do plasmídeo pGluc-NS-Neo

Células 293T foram incubadas em placa de 12 poços durante 24 horas em meio DMEM + 10%SFB, a uma concentração de $1,5 \times 10^5$ a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂. Em um tubo *ependorf* foram inseridos 4 µg de DNA, sendo 0,8 µg de cada plasmídeo a ser utilizado (pJG-HW2000-2013-PA, -PB1, -PB2, -NP, pGluc-NS-Neo), 12 µL do reagente *FuGENE HD Transfection Reagent* (Promega), e 985 µL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino. Em seguida, 750 µL da mistura

discriminada acima, 250 µL de DMEM sem soro e 10 µL de SFB foram adicionados às células 293T aderidas, após o descarte do sobrenadante das mesmas. Vinte e quatro horas após a transfecção, 10 µL do sobrenadante das células foi coletado e transferido para uma placa branca de 96 poços e a ele foram adicionados 50 µL da solução contendo BioLux GLuc Assay Buffer e BioLux Gluc Substrate (BioLabs inc.) de acordo com as orientações do fabricante. Por fim, a placa foi levada ao luminômetro Mithras LB 940 (Berthold) para aferir a atividade da *Gaussia* luciferase.

4.5 Teste de citotoxicidade da Geneticina

A fim de determinar qual concentração de Geneticina seria capaz de garantir a melhor seleção dos clones obtidos através da transfecção celular, a toxicidade da droga foi avaliada em células Vero em diferentes concentrações (100-1000 µg/mL) em meio DMEM completo durante 10 a 15 dias. Para tal, células Vero, a uma concentração de 1×10^5 , foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas a 37 °C a 5% de CO₂. Vinte e quatro horas após foram adicionadas ao meio diferentes concentrações da droga Geneticina. Através da observação do efeito citotóxico foi realizada a padronização da droga de seleção. A concentração da droga responsável por matar 100% das células no décimo dia foi a escolhida para ser utilizada na seleção dos clones.

4.6 Teste de citotoxicidade da Hygromicina

A fim de determinar qual concentração de hygromicina seria capaz de garantir a melhor seleção dos clones obtidos através da transfecção celular, a toxicidade da droga foi avaliada em células A549 em diferentes concentrações (100-1000µg/ml) em meio DMEM completo durante 10 a 15 dias. Para tal, células A549, a uma

concentração de 1×10^5 , foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas a 37 °C a 5% de CO₂. Vinte e quatro horas após foram adicionadas ao meio diferentes concentrações da droga Hygromicina. Através da observação do efeito citotóxico foi realizada a padronização da droga de seleção. A concentração da droga responsável por matar 100% das células no décimo dia foi a escolhida para ser utilizada na seleção dos clones.

4.7 Transfecção da célula Vero com o pGluc-NS-Neo

Vinte e quatro horas antes da transfecção, células Vero na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL foram semeadas em placas de cultura de doze poços e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida foi realizada a transfecção com o plasmídeo pGLuc-NS-Neo através do uso do reagente Fugene (Promega), seguindo as orientações do fabricante. Brevemente, após a adesão das células na placa de doze poços foram adicionados 750 µL do mix de transfecção composto pelo DNA, o reagente Fugene e meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino, mais 250 µL de DMEM e 10 µL de SFB. Vinte e quatro horas após a transfecção foi adicionado ao meio a droga de seleção e, diariamente, foi realizado o descarte do sobrenadante seguido da adição de um meio de seleção novo, procedimento esse com duração de 15 dias, quando os primeiros clones transfectados começaram a crescer. As células transfectadas, uma vez selecionadas, foram expandidas e estocadas.

4.8 Transfecção da célula A549 com o plasmídeo ISRE-Luc-Hygro

Células A549 foram semeadas em placas de 12 poços em uma concentração de $0,9 \times 10^5$ / mL e deixadas para aderirem durante 24 horas a 37 °C em uma

atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, foram transfectadas utilizando o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen) seguindo orientações do fabricante. Brevemente, em um tubo *ependorf*, o plasmídeo ISRE-Luc-Hygro foi inicialmente diluído em 200 µl de meio DMEM, sem SFB, a uma concentração final de 2 µg/mL. No mesmo tubo foram adicionados 4 µL do reagente lipofectamine 2000, misturado gentilmente e então incubados em temperatura ambiente durante 25 minutos para possibilitar a formação dos complexos lipofectamine-DNA. Em seguida, o sobrenadante das células A549 aderidas na placa de 12 poços foi retirado e então foi adicionado 1 mL de meio de cultura DMEM com SFB e 100 µL do complexo lipofectamine-DNA. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram continuamente cultivadas em meio de seleção (com o antibiótico hygromicina) para que fosse possível a seleção daquelas que foram eficientemente transfectadas.

4.9 Clonagem biológica por diluição limitante

As células Vero transfectadas com o plasmídeo pGluc-NS-Neo e células A549 transfectadas com o plasmídeo pISRE-Luc-Hygro foram incubadas em placas de 96 poços a uma concentração de uma célula por poço em uma temperatura de 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ em seu respectivo meio de seleção. Durante o quinto dia de incubação, os poços contendo clones de células individuais e resistentes à droga foram selecionados, crescidos e expandidos.

4.10 Caracterização da linhagem Vero-Gluc-NS-Neo

Os clones individuais de células obtidos foram avaliados quanto sua capacidade de expressão do gene repórter na presença do vírus da influenza A/Puerto Rico/1934/H1N1/HA-N117D de forma a selecionar os clones (Vero-pGLuc-

NS-Neo) com melhor expressão do gene repórter. A infecção da linhagem celular repórter com o vírus da influenza resulta na expressão do gene *Gluc* e a luminescência emitida devido a expressão desse gene repórter é utilizada para monitoramento da replicação viral e atividade antiviral do composto em estudo. Para tal, as células Vero-Gluc-NS-Neo foram incubadas em placas de 96 poços com meio DMEM suplementado com 10% SFB, a uma concentração de $2,5 \times 10^4$ células por poço, durante 24h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e então, foi adicionado o meio DMEM 0,2% BSA, sem soro fetal bovino, com tripsina-TPCK a $1 \mu\text{g/mL}$ contendo o vírus da Influenza A/Puerto Rico/1934/H1N1/HA-N117D em MOI (*Multiplicity of infection*) diferentes. Após uma hora de adsorção, o sobrenadante foi desprezado e as células infectadas seguiram incubadas apenas com DMEM 0,2% BSA mais TPCK durante 72h.

A leitura da GLuc foi realizada de 12 em 12 horas, utilizando o procedimento previamente descrito no item 4.4.

4.11 Caracterização da linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro

Os clones individuais de células obtidos foram avaliados quanto à expressão do gene da Fluc na presença de IFN- α . A A549-ISRE-Luc-Hygro foi semeada em placas de 12 poços, a uma concentração de $1,5 \times 10^5$, durante 24h em meio DMEM mais 10% SFB. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 μL de IFN- α a uma concentração de 2000 UI/mL. A análise da expressão da luciferase foi realizada de duas em duas horas após a incubação até alcançar o tempo de 10 horas. Para tal, o meio de cultura retirado dos poços e, após serem lavadas duas vezes com tampão PBS, as células foram lisadas durante cinco minutos através da adição de 100 μL do reagente de lise 1X, *Cell Culture*

lysis Reagent (PROMEGA), e então 50 µL do lisado foi transferido para uma placa branca de 96 poços e a ele foram adicionados 100 µL do substrato luciferina (PROMEGA). Por fim, foi realizada a leitura imediata da atividade da luciferase através do luminômetro Mithras LB 940 (Berthold). Os melhores clones foram selecionados e utilizados nos demais ensaios. Para a determinação do tempo de incubação e concentração ideais do IFN- α , as células foram incubadas com as concentrações de 0, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 UI/mL da citocina e a atividade da luciferase foi avaliada durante os tempos de 0, 2, 4, 6, 8, e 10h..

Por fim, a A549-ISRE-Luc-Hygro foi incubada com 1 µg/mL de Poliinosínico: ácido policitidílico (Poly I:C), um imunoestimulante sintético estruturalmente semelhante ao RNA dupla fita que se encontra presente em alguns vírus. Após seis horas de incubação a atividade da luciferase foi mensurada.

4.12 Infecção da Linhagem A459-ISRE-Luc-Hygro com o vírus A/Puerto Rico/1934/H1N1/HA-N117D

Com o intuito de se observar a capacidade de indução do IFN- α pelo vírus da Influenza A, a célula A549-ISRE-Luc-Hygro foi semeada em placas de 96 poços, com meio DMEM + 10% SFB, a uma concentração de $1,5 \times 10^4$, em um volume final de 100 µL. Após 24h, o sobrenadante foi descartado e as células foram inoculadas com o vírus PR8-HA-N117D através da adição de 100 µL de meio DMEM/0,2% de BSA, antibióticos (1% de Penicilina e Streptomicina), 1% de l-glutamina (2mM), 2,5% de HEPES *buffer* (25mM) e TPCK-tripsina (1µg/ml), contendo o vírus em diferentes MOI (1, 5 e 10). Após uma hora de adsorção, as partículas virais que não penetraram nas células foram descartadas e então foi adicionado aos poços 100 µL

de meio DMEM + 10% SFB. A leitura da atividade do gene repórter foi avaliada após 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de incubação.

4.13 Transfecção da linhagem Vero-Gluc-NS-Neo com o complexo vRNP

Vinte e quatro horas antes da transfecção, a linhagem Vero-Gluc-NS-Neo, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células / mL, foi semeada em placa de cultura de doze poços e incubada a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, foi realizada a transfecção com os plasmídeos que codificam para a RNA polimerase e segmento NP viral (PA, PB1, PB2 e NP) através do uso do reagente Fugene (Promega), seguindo as orientações do fabricante como descrito anteriormente no tópico 4.7. Para que fosse possível aferir também a eficiência da transfecção e assegurar a funcionalidade do vRNP, foi transfectado, juntamente com os demais, e utilizado como controle interno positivo um outro plasmídeo portando o gene repórter RFP flanqueado pelas regiões 3' e 5' UTR do vírus influenza. Como controle negativo, a transfecção foi realizada com a ausência do pNP. Após 48h, foi realizada a leitura da atividade da *Gaussia* luciferase e o controle positivo interno foi analisado através do microscópio de fluorescência.

5. RESULTADOS

5.1 Construção do plasmídeo pGluc-NS-Neo

O plasmídeo pGluc-NS-Neo foi construído utilizando fragmentos do plasmídeo pGluc-NS e o vetor pCDNA3.1 de 4711pb e 1087pb, respectivamente. Após a purificação e ligação destes fragmentos foi obtido o plasmídeo pGluc-NS-Neo, que por sua vez foi inserido em bactérias competentes, clonado e por fim submetido a

uma PCR de colônia onde foram utilizados *primers* específicos para a amplificação do DNA construído (resultados não mostrados).

5.2 Teste de citotoxicidade da droga geneticina e higromicina

Células Vero e A549 foram incubadas com diferentes concentrações da droga geneticina e higromicina, respectivamente, e o efeito citotóxico foi observado durante 10 dias. Dentre as diferentes concentrações de droga que foram testadas, observou-se que a de 500µg/mL (geneticina) e de 300µg/mL (higromicina) induziu a morte de 100% das células transfectadas com o plasmídeo pGluc-NS-Neo e pISRE-Luc-Hygro no décimo dia de incubação. Portanto, essas foram as concentrações de geneticina e higromicina adicionadas ao meio de cultura para compor assim o meio de seleção pós-transfecção e o meio utilizado no decorrer do trabalho.

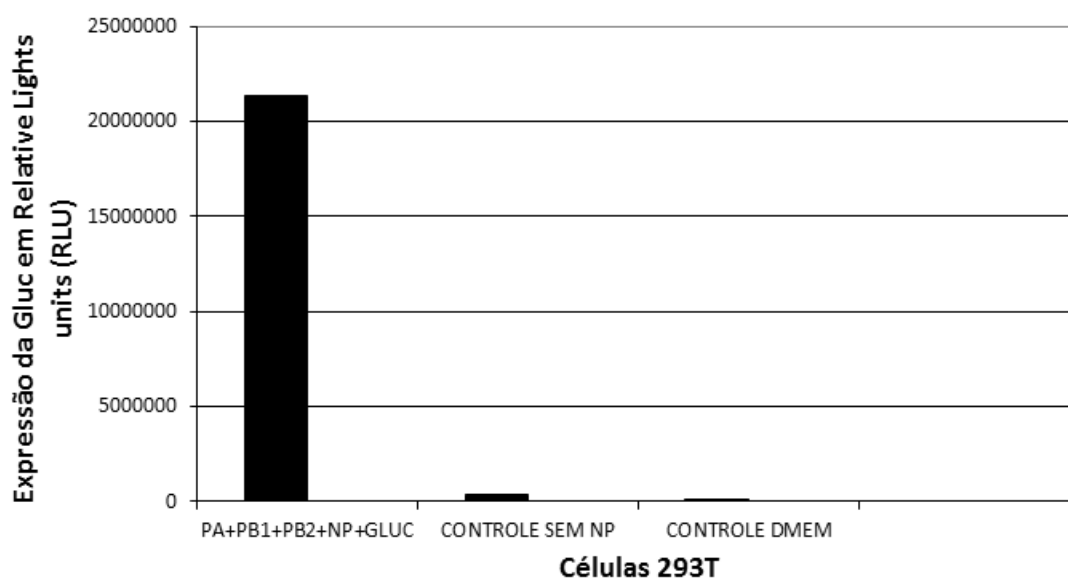
5.3 Análise de expressão do gene repórter do plasmídeo pGluc-NS-Neo

Como teste preliminar para avaliação da funcionalidade do plasmídeo construído pGluc-NS-Neo, células 293T foram transfectadas com cinco diferentes plasmídeos. Três desses codificando os segmentos PA, PB1 e PB2 do vírus da Influenza A, os quais correspondem às subunidades da enzima RNA polimerase viral, um plasmídeo codificando o segmento NP, segmento esse necessário à replicação viral e síntese de RNA, e o plasmídeo pGluc-NS-Neo contendo o gene repórter. Células transfectadas sem o plasmídeo NP e com o meio de cultura foram utilizadas como controle negativo.

A transfecção foi realizada utilizando o reagente Polyfect (Qiagen) seguindo orientações do fabricante. Vinte e quatro horas após a transfecção, a expressão do gene repórter foi mensurada utilizando o luminômetro. Os resultados mostram que

as células transfectadas com os cinco plasmídeos tiveram uma expressão visivelmente aumentada do gene repórter quando em comparação com os grupos controle (Figura 8), evidenciando a funcionalidade do plasmídeo pGluc-NS-Neo.

Figura 8 - Expressão da *Gaussia* luciferase 24 horas após a transfecção. *Relative light units* (RLU).



5.4 Transfecção das células com o plasmídeo pGluc-NS-Neo e pISRE-Luc-Hygro e clonagem biológica por diluição limitante

Células Vero transfectadas com o plasmídeo pGluc-NS-Neo e células A549 transfectadas com o pISRE-Luc-Hygro foram incubadas com seu respectivo meio de seleção em placas de 96 poços em uma concentração de uma célula por poço. Durante 10 dias as células foram observadas com microscópio óptico a fim de se encontrar poços onde existissem clones de células provenientes de uma única célula. Dez clones diferentes da linhagem Vero-Gluc-NS-Neo e vinte clones da

linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro foram obtidos e crescidos, sendo em seguida estocados a -80°C para posterior utilização.

5.5 Caracterização da linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro

Os clones individuais de células obtidos foram avaliados quanto à expressão do gene da *Fluc* na presença de IFN- α . O plasmídeo pISRE-Luc-Hygro possui o promotor ISRE (*Interferon-Stimulated Response Element*) clonado juntamente com o gene repórter da *Firefly* luciferase e, quando o IFN-I (IFN- α e β) se encontra presente do meio de cultura celular, é capaz de ativar este promotor levando à expressão do gene *Fluc*. Dos 20 clones testados, quatro expressaram a luciferase (Figura 9), sendo dois de maneira mais eficiente, o clone 10 e 14, os quais foram escolhidos para caracterização. A fim de determinar o melhor tempo de incubação das células com o IFN- α , os clones da linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro foram incubados com a citocina na concentração de 1000 UI/mL durante um total de 10 horas, em seguida as células foram então lisadas para a avaliação da expressão da luciferase de 2 em 2 horas (Figura 10).

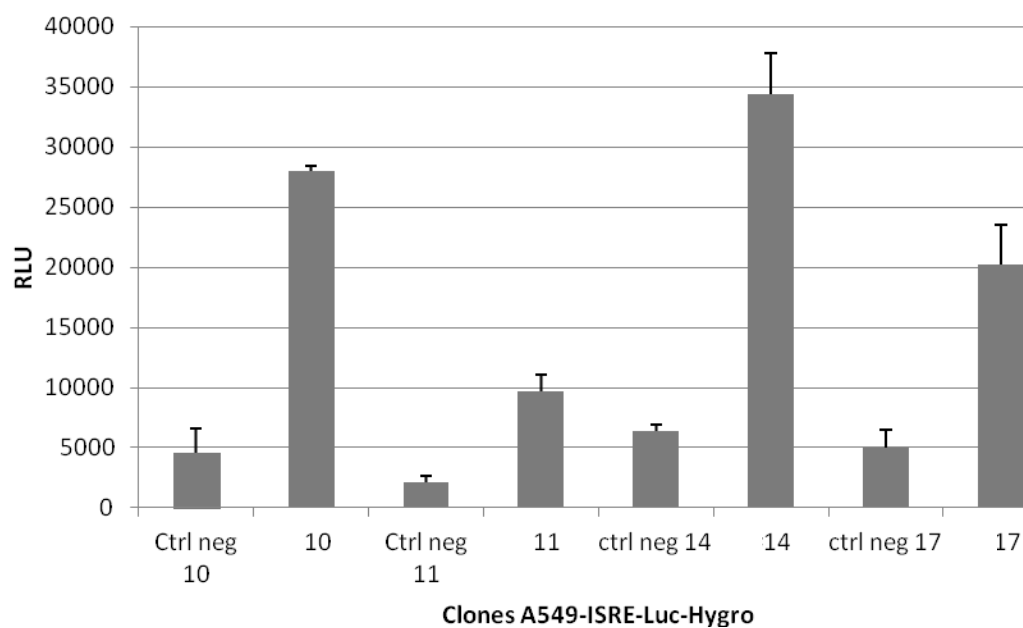


Figura 9 - Leitura da expressão do gene Fluc pelos clones 10, 11, 14 e 17 da linhagem celular A549-ISRE-Luc-Hygro após 24 horas de estímulo com IFN- α (1000 UI/mL).

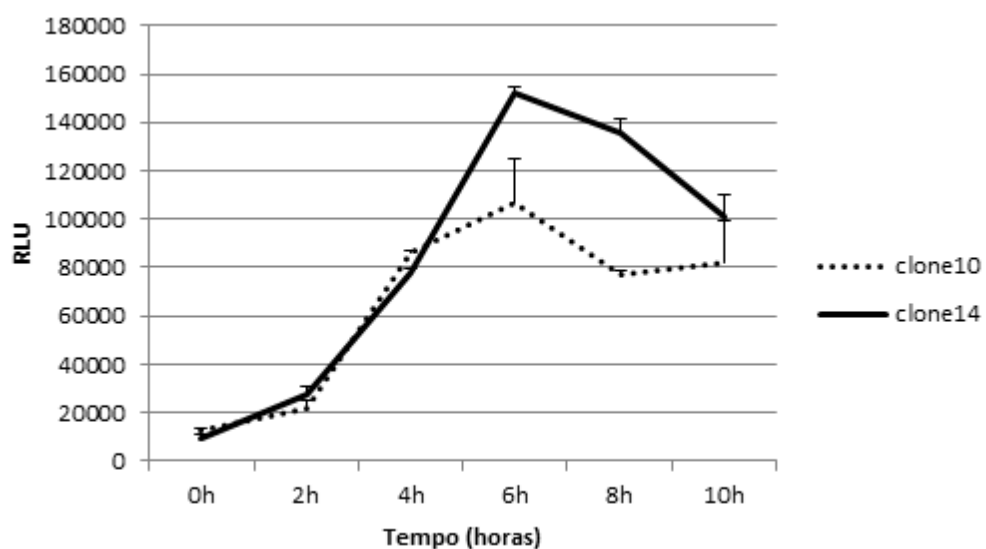


Figura 10 - Leitura da expressão do gene Fluc pelos clones 10 e 14 da linhagem celular A549-ISRE-Luc-Hygro após o estímulo com IFN- α (1000 UI/mL).

Foi possível observar que os dois clones testados expressaram de forma eficiente a proteína do gene repórter quando comparadas ao controle (0h), atingindo um pico de expressão 6 horas pós-estímulo. A partir da determinação do tempo ideal de incubação da linhagem, as células foram submetidas ao estímulo de diferentes concentrações do IFN- α (Figuras 12 e 13). De acordo com os resultados obtidos, a concentração que melhor estimulou a expressão da luciferase foi de 250 UI/mL para os dois clones 10 e 14, apresentando um aumento maior que 10 vezes na leitura da luminescência emitida pelo Fluc quando comparada ao grupo controle, no qual não foi realizado nenhum estímulo com IFN- α . Após atingir o pico, a expressão da luciferase se torna relativamente estável, apesar do aumento na concentração da citocina que atinge seu máximo no ensaio em 2000 UI/mL.

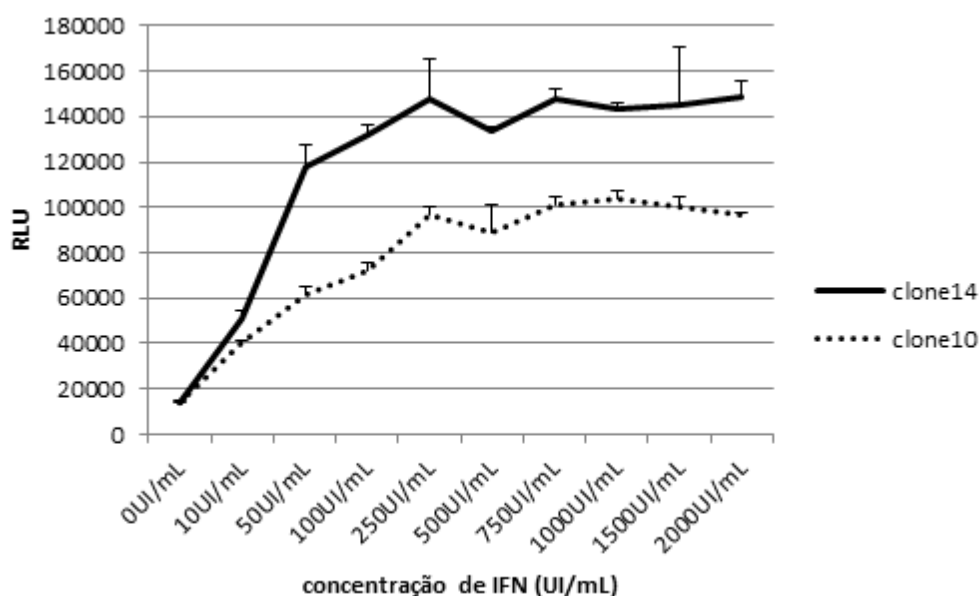


Figura 11 - Expressão da luciferase na linhagem celular A549-ISRE-Luc-Hygro em RLU após 6 horas de estímulo com o IFN- α em diferentes concentrações.

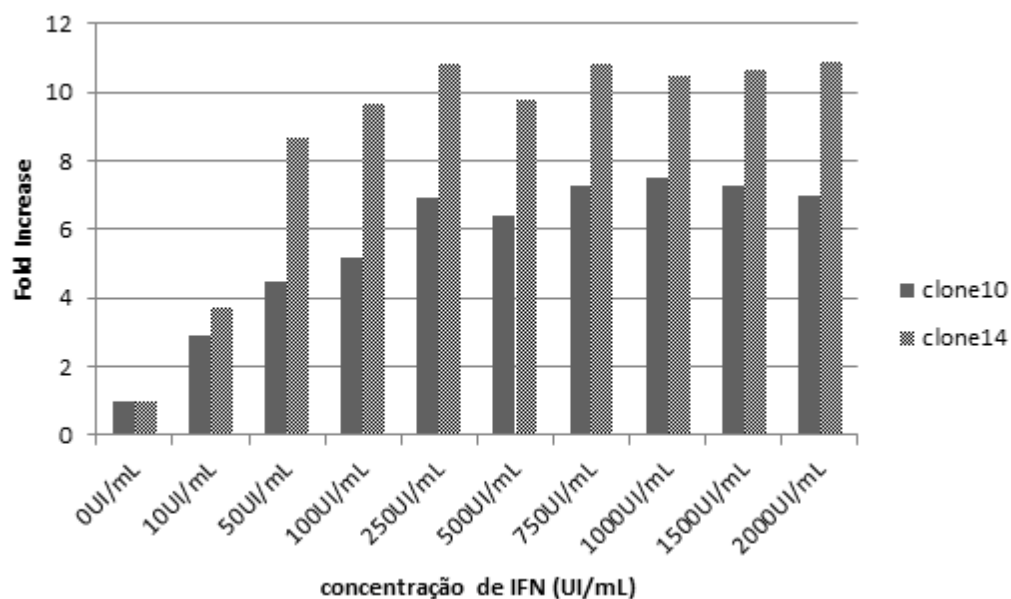


Figura 12 - Expressão da luciferase da linhagem celular A549-ISRE-Luc-Hygro após 6 horas de estímulo com o IFN- α em diferentes concentrações.

Um segundo parâmetro utilizado para a caracterização da linhagem celular repórter A549-ISRE-Luc-Hygro foi o estímulo da síntese de IFN pela célula através de sua incubação com Poly I:C (Figura 13).

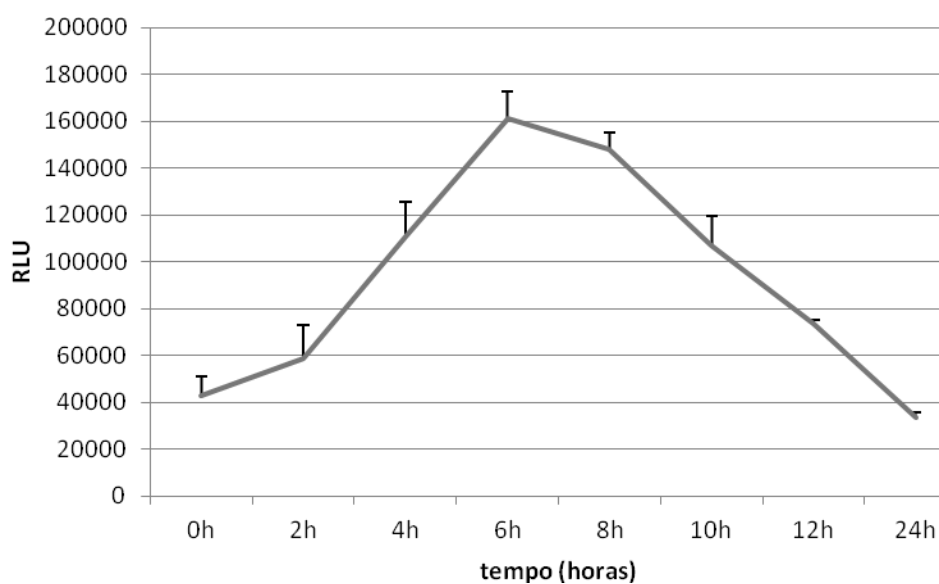


Figura 13 - Atividade da luciferase na linhagem celular A549-ISRE-Luc-Hygro após 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h e 24h de estímulo com Poly I:C (1µg/mL).

Após duas horas de incubação, já é possível observar a atividade da luciferase consequente à ativação do promotor ISRE, o que caracteriza a rapidez do desenvolvimento da resposta imune inata pelo hospedeiro, além da sensibilidade do ensaio. Após 4 horas de estímulo, a expressão do gene repórter já duplica em relação ao controle (Figura 14), onde as células foram incubadas exclusivamente com meio de cultura. A atividade da luciferase atinge seu máximo após 6 horas de estímulo com Poly I:C (160 000 RLU), demonstrando a alta sensibilidade e capacidade de detecção e resposta da linhagem ao IFN-I e, conseqüentemente, aos seus indutores.

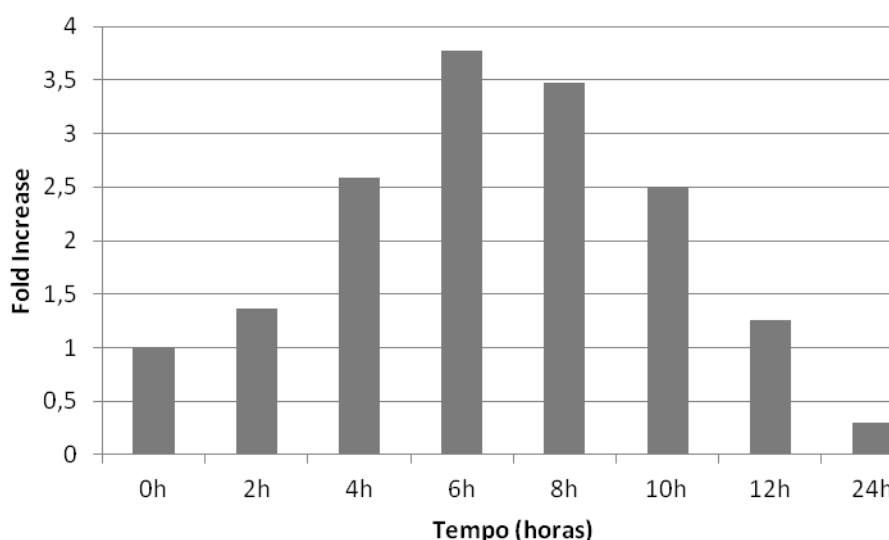


Figura 14 - Expressão da luciferase na linhagem celular A549-ISRE-Luc-Hygro após 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de estímulo com o Poly I:C.

5.6 Infecção da linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro com o vírus A/PuertoRico/8-HA-N117D

O vírus da Influenza, assim como outros vírus, possui a capacidade de induzir a síntese de IFN-I pelas células do hospedeiro no qual ele se encontra e, dessa forma, estimula a expressão de diversos genes envolvidos com a resposta imune, levando à célula ao conhecido “estado antiviral”. Baseado nesta característica viral, diferentes MOI do vírus PR8-HA-N117D foram inoculados na célula A549-ISRE-Luc-Hygro e, em seguida, foi realizada a leitura da expressão do gene repórter em diferentes tempos pós-infecção (Figura 15). O vírus se mostrou capaz de induzir a síntese do IFN-I já no MOI de 1, onde é possível observar uma crescente expressão da luciferase pela célula até o alcance de 12 horas após infecção, a partir deste ponto a atividade da luciferase entra em declínio até atingir o mínimo 24 horas pós-infecção, se igualando ao controle negativo. De acordo com o gráfico obtido, O MOI de 10 demonstrou uma melhor eficiência na indução da citocina, com consequente expressão do gene, permitindo uma melhor análise do sistema repórter em estudo. Também atingindo o pico de expressão 12 horas p.i., o MOI de 10 e o tempo de infecção de 10 horas foram escolhidos como parâmetros ideais para a posterior utilização da linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro para os seus possíveis fins, incluindo a triagem de antivirais contra o Influenza, como é o caso do presente estudo.

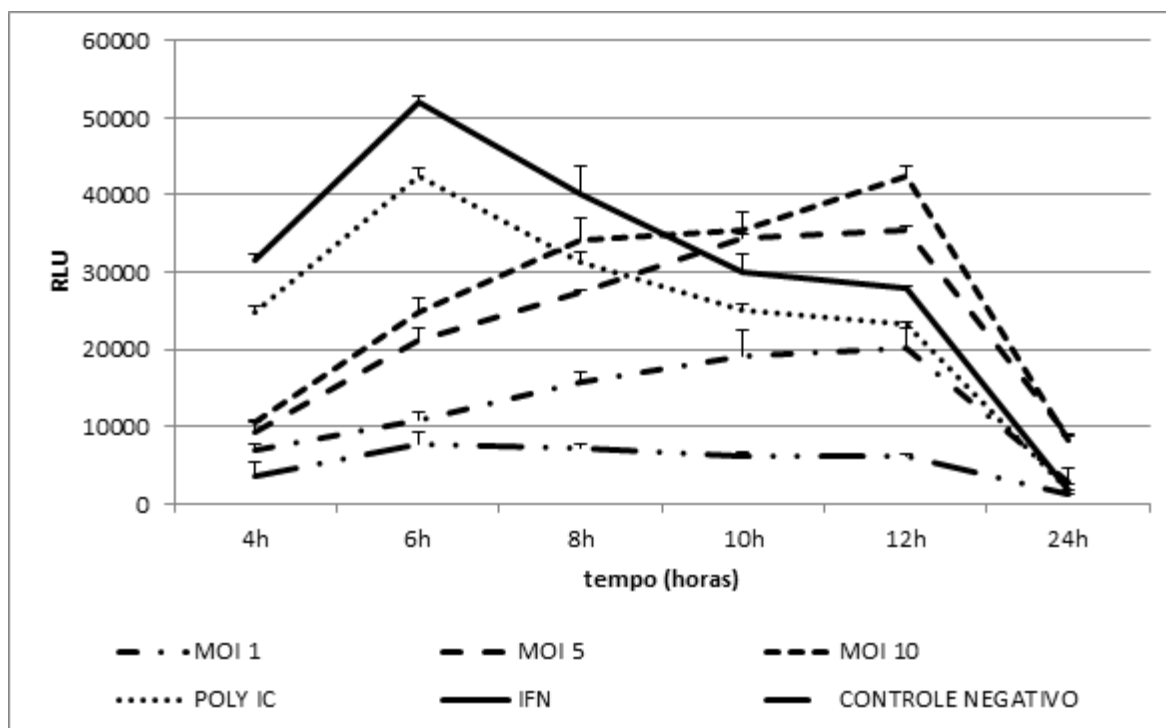


Figura 15 - Expressão da *Firefly* luciferase na linhagem celular A549-ISRE-Luc-Hygro após 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de infecção com vírus PR8-HA-N117D. Como controle positivo do ensaio foi utilizado Poly I:C e IFN- α . Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura DMEM.

5.7 Infecção da linhagem Vero-Gluc-NS-Neo com o vírus A/PuertoRico/8-HA-NA117D

Após a realização da seleção dos clones eficientemente transfectados, cinco destes foram infectados com o vírus no MOI de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 e 10. De acordo com os resultados obtidos, não foi possível observar a expressão e consequente atividade da *Gaussia* luciferase em nenhum dos clones testados (resultados não mostrados). A mensuração da GLuc foi realizada 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção da linhagem com o vírus influenza A.

5.8 Transfecção da linhagem com o complexo vRNP

A linhagem celular Vero-Gluc-NS-Neo foi transfectada com os plasmídeos pJG-HW2000-2013-PA, -PB1, -PB2 e -NP. Como controle interno positivo foi

utilizado o plasmídeo KW-RFP como mencionado em material e métodos. Quarenta e oito horas após a transfecção, apesar de não ter sido detectada a expressão da GLuc em nenhum dos clones testados, foi possível observar a fluorescência emitida pela proteína RFP expressa nas células ao serem analisadas no microscópio de fluorescência (Figura 16), demonstrando a funcionalidade do complexo vRNP bem como a eficiência da transfecção.

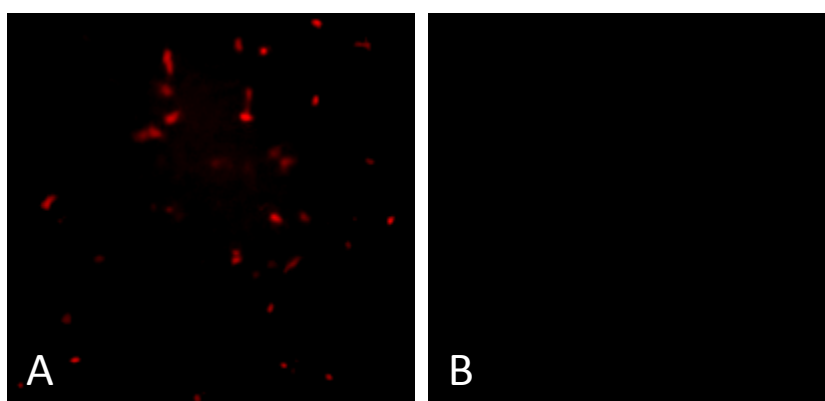


Figura 16 – Microscopia de fluorescência. A- controle positivo interno: célula Vero-Gluc-NS-Neo transfectada com vRNP e RW-RFP. B- controle negativo: célula Vero-Gluc-NS-Neo transfectada com pJG-HW2000-2013-PA, -PB2 e -NP.

6. Discussão

Neste trabalho foi primeiramente construído o plasmídeo portando o gene repórter da *Gaussia* luciferase (GLuc) e o neomicina fosfotransferase, o pGluc-NS-Neo, o qual foi confirmado por PCR, além de digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *Neb 4* e *MfeI* I. O que caracteriza o sistema como específico para influenza A é o fato da GLuc estar clonada entre as regiões não codificantes do segmento NS do vírus, região esta conhecida por possuir o promotor para a RNA

polimerase viral, e se encontrar clonada no sentido inverso. Constitutivamente, a célula estará transcrevendo o plasmídeo em questão, porém, o transcrito sintetizado possuirá sentido negativo não podendo ser reconhecido pela maquinaria de tradução da célula hospedeira. Apenas quando o vírus influenza se encontra infectando a célula, é que então ocorrerá a transcrição do RNAm que dará origem à proteína *Gaussia* luciferase.

Os resultados obtidos mostram que o plasmídeo pGluc-NS-Neo está em perfeito funcionamento quando transfectado juntamente com os plasmídeos codificando a RNA polimerase viral em célula 293T, evidenciando a especificidade bem como a sensibilidade do sistema construído.

Após comprovação da eficiência do pGluc-NS-Neo, este foi transfectado em células Vero para se obter a linhagem celular desejada, e em seguida as células foram selecionadas e por fim testadas em relação ao gene repórter através da infecção com o vírus influenza, onde não foi observada expressão significativa do gene repórter GLuc quando comparado ao grupo controle (não infectado). A linhagem construída foi em seguida transfectada com os plasmídeos que codificam para a RNA polimerase viral, juntamente com um outro plasmídeo contendo RFP e a região promotora para o IAV como controle interno do ensaio. Apesar de ter sido observada fluorescência emitida pela RFP no grupo controle, não foi observada a expressão do GLuc. Dentro deste cenário, várias hipóteses foram levantadas para tentar explicar a ineficiência do sistema construído:

a) Efeito tóxico da TPCK-tripsina sobre as células Vero-Gluc-NS-Neo.

Como mencionado anteriormente, o uso da TPCK-tripsina durante a infecção por influenza é necessário para que ocorra a clivagem da glicoproteína de membrana, HA, em HA1 e HA2, e, dessa forma, o vírus consiga penetrar na

célula hospedeira. Porém, ao se observar o grupo controle ao microscópio óptico, i.e não-infectado, foi possível detectar intenso estresse celular que poderia ter sido então provocado pelo tratamento com a tripsina. Uma outra problemática em torno do uso da tripsina durante a infecção viral seria a discutida anteriormente por Winkler e colaboradores em 2014, onde eles demonstram a possibilidade da TPCK-tripsina diminuir o tempo de meia-vida da proteína *Gaussia* luciferase no sobrenadante.

Visto isso, o experimento foi procedido na presença da tripsina apenas durante a fase de adsorção viral, enquanto que a manutenção das células infectadas e não-infectadas foi realizada na ausência total de tripsina. 12, 24, 48, 72, 96h após a infecção não foi detectada nenhuma expressão da GLuc, comprovando que este possivelmente não seria o motivo da não eficiência da linhagem repórter.

b) Ocorrência de mutações no pGluc-NS-Neo após ter sido inserido na célula Vero.

Com o intuito de descobrir o motivo pelo qual o sistema repórter construído não se mostrar funcional, foi realizada a extração do DNA celular de três clones diferentes pertencentes à linhagem Vero-Gluc-NS-Neo, e então, as amostras foram submetidas à uma reação de PCR como previamente descrita (resultados não mostrados). Confirmada a presença do DNA transfectado em todos os clones, o produto da PCR foi inteiramente sequenciado onde foi possível constatar que não houve nenhum tipo de mutação em nenhuma base nucleotídica das amostras sequenciadas, estando estas íntegras e iguais entre si e ao controle positivo.

O vírus da Influenza é o agente causador da gripe, doença essa de origem respiratória e altamente contagiosa, causadora de problemas econômicos e de

saúde pública em todo o mundo (Medina *et al.*, 2014). A infecção pelo IAV geralmente é auto-limitante quando acomete indivíduos adultos saudáveis, porém pode levar a complicações importantes quando presente em pessoas idosas e crianças. Apesar da vacinação ser a primeira linha de defesa contra esta doença, as estratégias disponíveis atualmente para produção e distribuição de vacinas não são adequadas quando deparadas com uma pandemia imprevisível (Hsieh e Hsu, 2007). Com isso, os antivirais são considerados de grande importância no controle e tratamento da doença, sendo necessário o desenvolvimento de métodos de triagem mais rápidos e menos laboriosos. Neste aspecto, genes repórteres induzidos por vírus fornecem um método rápido e sensível para detecção da replicação viral, bem como para a triagem de novos antivirais (Lutz *et al.*, 2005).

Durante anos pesquisadores de todo o mundo estudam um novo método eficaz para a triagem de antivirais contra os mais diversos patógenos, principalmente o influenza. Em 2010, Hossain e colaboradores, estabeleceram e caracterizaram uma linhagem celular repórter para ser utilizada em experimentos com o influenza. Para tal, a célula utilizada foi a MDCK (Madin-Darby canine Kidney), célula esta resistente ao efeito tóxico da tripsina (TPCK-tripsina), necessária para garantir os ciclos de infecção pelo vírus na célula. Os clones resultantes dos experimentos foram avaliados de acordo com a emissão de fluorescência, consequente à expressão do GFP, determinando a presença do plasmídeo dentro da célula transfectada, e em relação à indução da expressão do gene *Firefly* luciferase, consequente à atividade do vírus influenza ao infectar a linhagem celular, e resultados promissores foram obtidos.

Trabalhos semelhantes foram desenvolvidos, descrevendo as vantagens de se utilizar sistemas de triagem baseados em células (Zhu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*,

2012; Kawaoka *et al.*, 2013; Gao *et al.* 2014; Medina *et al.*, 2014), e vários compostos possuindo atividade antiviral foram determinados e estudados, como o *Polygonum cuspidatum* e seus componentes ativos, e o composto 3-beta. A utilização de um sistema repórter para a triagem de antivirais vem sendo utilizado por outros pesquisadores no estudo de vírus causadores de doenças importantes, como o vírus da hepatite C (HCV) (Ching Lee *et al.*, 2010), o vírus sincicial respiratório (Kwanten *et al.*, 2013) e o vírus HIV (Geluykens *et al.*, 2013). Zhu e colaboradores, em 2005, também demonstraram a utilização de um sistema repórter baseado na secreção da *Gaussia* luciferase, trabalho este desenvolvido com o objetivo de avaliar a atividade da RNA polimerase do vírus da Influenza, obtendo resultados interessantes como a alta sensibilidade do sistema e estabilidade na expressão desta proteína pelo gene repórter.

Tendo em vista outros estudos similares já publicados na literatura, que obtiveram êxito ao desenvolver linhagens celulares repórteres portando um sistema muito próximo ao desenvolvido neste trabalho, inclusive com o gene da *Gaussia* luciferase clonado entre as regiões não traduzidas do vírus influenza (Gao *et al.*, 2014), faz com que se possa afirmar a necessidade de ensaios complementares para o melhor entendimento do não funcionamento da linhagem aqui descrita. Importante frisar que, o plasmídeo pGluc-NS-Neo se encontra em pleno funcionamento como comprovado pelos resultados obtidos, o que mostra o sucesso da estratégia estudada e o seu potencial uso em estudos futuros. Ainda existem hipóteses importantes para serem discutidas e trabalhadas, como a possibilidade do vírus A/PuertoRico/8/-HA-N117-D utilizado nos experimentos não estar infectando de maneira eficiente a célula em questão, sendo necessário um futuro ensaio de imunofluorescência para ser possível de avaliar a presença, ou não, do vírus dentro

da célula. Uma outra problemática seria o quão o promotor do plasmídeo construído está acessível à maquinaria celular para que possa ser transcrito eficientemente.

Ainda sobre a busca por novos antivirais, o sistema imunológico cada vez mais vem se tornando alvo de estudo dos pesquisadores quando se trata de combate aos mais diversos vírus que acometem a população. Em relação ao IAV, a resposta imune à infecção se faz, principalmente, através do desenvolvimento do “estado antiviral”, onde citocinas como as pertencentes à família do IFN-I possuem um importante papel (Palese *et al.*, 2012; Satoh *et al.*, 2012). Durante o desenvolvimento da linhagem Vero-Gluc-NS-Neo descrita anteriormente, uma segunda linhagem celular foi construída com o intuito de se obter um novo método de triagem de antivirais voltado para moléculas capazes de induzir a síntese do IFN. A A549-ISRE-Luc-Hygro possui o gene *Fluc* dirigido pelo promotor o ISRE, o qual é ativado na presença de IFN-I.

De acordo com os resultados obtidos, a linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro foi capaz de expressar o gene repórter de maneira eficiente quando estimulada com o IFN- α . Após 6 horas de incubação com o IFN- α na concentração de 250 UI/mL, a atividade da luciferase foi 10 vezes maior em relação ao controle, demonstrando a sensibilidade do sistema. A linhagem também foi submetida ao estímulo com uma importante molécula indutora de IFN- α , o Poly I:C, um RNA dupla fita sintético que pode ser reconhecido pela célula hospedeira e mimetizar uma infecção viral (Flavell *et al.*, 2001). Após 4 horas de estímulo com Poly I:C, a atividade da *Fluc* já dobra em relação ao controle, chegando ao seu máximo com 6 horas de incubação. Após 24 horas, o IFN parece já não ser mais produzido pela célula em resposta ao Poly I:C, fazendo com que os níveis da proteína repórter se igualem aos níveis encontrados no grupo controle.

O interessante é que fenômeno parecido foi encontrado quando a linhagem celular foi infectada com diferentes MOI do vírus influenza, onde, apesar do pico de expressão do Fluc ser atingido após 12h de incubação com o vírus, 24 horas p.i já não é mais possível observar atividade do gene repórter. Esse padrão observado nos experimentos realizados demonstra a rapidez com que a resposta imune inata do hospedeiro se estabelece ao receber estímulos exógenos como o Poly I:C e um vírus, como o influenza, capaz de induzir a síntese de IFN (Killip *et al.*, 2015). Com isso, a linhagem celular repórter A549-ISRE-Luc-Hygro se mostra uma ferramenta importante para a busca de novas moléculas que estimulem o sistema imune através da indução do IFN-I, e então dessa forma se tornem potenciais drogas antivirais.

Outros trabalhos já são encontrados na literatura descrevendo o desenvolvimento e uso de linhagens celulares repórteres possuindo gene *Firefly* luciferase, como é o caso de Patel e colaboradores e Palese e colaboradores, ambos publicados em 2012, onde são descritos mais de 18 compostos indutores de IFN-I encontrados através do uso da linhagem por eles construídas.

Além do uso da linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro na triagem de moléculas indutoras de IFN-I, a mesma também pode ser utilizada como ferramenta na triagem de drogas específicas para vírus indutores de IFN-I, como é o caso do IAV (Ea *et al.*, 2015). Ao ser incubada com um novo composto e o vírus indutor, a linhagem celular repórter tornará possível a determinação da atividade antiviral do composto em estudo através da inibição (ou não) do vírus, e sua consequente inibição (ou não) na indução do IFN-I, fazendo com que expresse (ou não) o gene repórter *Firefly* luciferase.

7 Conclusões

1. O plasmídeo pGluc-NS-Neo se mostrou eficiente quando transfectado juntamente com o complexo RNPv, comprovando a funcionalidade do sistema construído;
2. Apesar dos vários experimentos realizados com o intuito de se determinar as melhores condições de funcionamento da linhagem Vero-Gluc-NS-Neo, não foi possível demonstrar, durante este trabalho, a eficiência do sistema repórter para o seu uso na triagem de antivirais para influenza. Ensaio complementares se fazem necessários;
3. A linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro desenvolvida representa um novo método eficiente de triagem de drogas indutoras de IFN-I, levando em conta que a capacidade imunomodulatória é uma característica importante e desejada quando se trata de antivirais;
4. A linhagem A549-ISRE-Luc-Hygro se mostrou uma ferramenta importante para auxiliar no estudo da indução da resposta imunológica inata induzida por vírus.

8. Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed., 2003.

ADHIAMBO, M. Okomo et al. Host cell selection of influenza neuraminidase variants: implications for drug resistance monitoring in A(H1N1) viruses. *Antiviral Res*, v. 2, p. 381-388, 2007.

ALAM, J.; COOK, J. L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, v. 188, n. 2, p. 245-254, 1990.

ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, v. 413, n. 6857, p. 732-738, 2001.

ATKINS, C. et al. Screening methods for influenza antiviral drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, v. 7, n. 5, p. 429-438, 2012.

- BADR, C.; TANNOUS, B. A. Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends in biotechnology*, v. 29, n. 12, p. 624-633, 2011.
- BARIK, S. New treatments for influenza. *BMC Medicine*, v. 10, n. 104, 2012.
- CHEN, L. M., et al. Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses. *PLoS pathogens*, v. 1, n. 11, 2012.
- DAI, J. et al. High-throughput screening for anti-influenza A virus drugs and study of mechanism of procyanidin on influenza A virus-induced autophagy. *Journal of biomolecular screening*, v. 17, n. 5, p. 605-617, 2014.
- DAI, J. P. et al. A drug screening method based on the autophagy pathway and studies of mechanism of evodiamine against influenza A virus. *Plos one*, v. 7, n. 8, 2012. doi: 10.1371.
- DEMPOYA, J. et al. Double-Stranded RNA Induces Biphasic STAT1 Phosphorylation by both Type I Interferon (IFN)-Dependent and Type I IFN-Independent. *Journal of Virology*, v. 86, n. 23, p. 12760-12769, 2012.
- DIEBOLD, S. S. et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, v. 303, n. 5663, p. 1529-1621, 2004.
- DURBIN, J. E. et al. Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *J Immunol*, v. 164, n. 8, p. 4220-4228, 2000.
- ECKERT, N. et al. Influenza A Virus Encoding Secreted Gaussia Luciferase as Useful tool to Analyze Viral Replication and Its Inhibition by Antiviral Compounds and Cellular Proteins. *Plos one*, 2014. doi: 10.1371.
- FIELDS VIROLOGY. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. cap. 47, p. 1647-1689.
- FLORES, E. F. et al. Outras Família Virais. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. 1. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. v. 1, p. 841-859.
- FODOR, E. The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta virologica*, v. 57, p. 113-122, 2013.
- FROST, W. H. Statistics of influenza morbidity. *Public Health Report*, 584-597, 1920.
- GELUYKENS, P. et al. A fluorescence-based high-throughput screening assay to identify HIV-1 inhibitors. *Methods Mol Biol*, v. 1030, p. 3-9, 2013.
- GHENDON, Y. Introduction to pandemic influenza through history. *European Journal of Epidemiology*, v. 10, p. 451-453, 1994.
- HARUYAMA, T.; NAGATA, K. Anti-influenza virus activity of Ginkgo biloba leaf extracts. *J Nat Med*, v. 67, n. 3, 2012. doi: 10.1007.
- HAY, A. J. The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 channel protein. *Semin Virol*, v. 3, p. 21-30, 1992.

- HE, W. et al. Anti-influenza virus effect of aqueous extracts from dandelion. *Viol J*, v. 8, p. 538, 2011.
- HOSSAIN, M. J. et al. Establishment and Characterization of a Madin-Darby Canine Kidney Reporter Cell Line for Influenza A Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2515-2523, 2010.
- HSIEH, H. P.; HSU, J. T. Strategies of development of antiviral agents directed against influenza virus replication. *Current Pharma Design*, p. 3531-3542, 2007.
- ISLAM, T.; ITZSTEIN, M. Von. Anti-influenza drug discovery: are we ready for the next pandemic? *Adv Carbohydr Chem Biochem*, v. 61, p. 293-352, 2007.
- IWASAKI, A.; PILLAI, P. S. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol*, p. 315-328, 2014.
- JOHNSON, N. P.; MUELLER, J. Updating the accounts: global mortality of the 1918–1920 “Spanish” influenza pandemic. *Bull Hist Med*, v. 76, p. 105–115, 2002.
- KAUFMANN, A. et al. Defense against Influenza A Virus Infection: Essential Role of the Chemokine System. *Immunobiol*, p. 603-613, 2001.
- KILBOURNE, E. D. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Inf Dis*, v. 12, n. 1, 2006.
- KILLIP, M. J.; FODOR, E.; RANDALL, R. E. Influenza virus activation of the interferon system. *Virus Research*, 2015. doi: 10.1016.
- KRAWITZ, C. et al. Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC Complement Altern Med*, 2011. doi: 10.1186.
- KWANTEN, L.; CLERCK, B.; ROYMANS, D. A fluorescence-based high-throughput antiviral compound screening assay against respiratory syncytial virus. *Methods Mol Biol*, v. 1030, p. 337-344, 2013.
- LEE, J. C. et al. A cell-based reporter assay for inhibitor screening of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Anal Biochem*, v. 1, n. 2, p. 52-62, 2010.
- LEE, J. C. et al. A cell-based reporter assay for inhibitor screening for hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Anal Biochem*, v. 403, n. 1-2, p. 52-62, 2010.
- LIN, C. J. et al. Polygonum cuspidatum and its active components inhibit replication of the influenza virus through toll-like receptor 9-induced interferon beta expression. *Plos one*, 2015. doi: 10.1371.
- LUPFER, C. et al. Increased Survivorship and Altered Cytokine Profile from Treatment of Influenza A H1N1-Infected Mice with Ekybion: A Drug Complex of Natural Extracts and Inorganic Compounds. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2010. doi: 192079.
- LUTZ, A. et al. Virus-inducible reporter genes as a tool for detecting and quantifying influenza A virus replication. *J Virol Methods*, v. 126, n. 1-2, p. 13-20, 2005.
- MEDINA, J. et al. Vero/CHOK1, a novel mixture of cell lines that is optimal for rescue of influenza A vaccine seeds. *Journal of Virological Methods*, v. 196, p. 25-31, 2014.

- NAYAK, D. P. et al. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research*, Amsterdam, p. 147-161, 2009.
- NICHOLSON, K. G.; WOOD, J. M.; ZAMBON, M. Influenza. *The Lancet*, n. 362, p. 1733-1745, 2003.
- NODA, T. et al. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*, v. 439, 2006.
- OZAWA, M. et al. A cell-based screening system for influenza A viral RNA transcription/replication inhibitors. *Scientific Reports*, 2013. doi: 10.1038.
- PALESE, P. et al. Identification of Small Molecules with Type I Interferon Inducing Properties by High-Throughput Screening. *Plos one*, 2012. doi: 10.1371
- PATEL, D. A. et al. High Throughput Screening for Small Molecule Enhancers of the Interferon Signaling Pathway to Drive Next-Generation Antiviral Drug Discovery. *Plos one*, 2012. doi: 10.1371.
- SAMJI, T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med*, v. 82, n. 4, p. 153-159, 2009.
- SHOPE, R. E. Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med*, v. 54, p. 373-380, 1931.
- SMITH, W. et al. A Virus Obtained From influenza Patients. *The Lancet*, 2004.
- STEEL, J. et al. Transmission of pandemic H1N1 influenza virus and impact of prior exposure to seasonal strains or interferon treatment. *Journal of Virology*, p. 21-26, 2010.
- SZEWCZYK, B.; SZEWCZYK, K. Bieńkowska; KRÓL, E. Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochimica Polonica*, p. 397-401, 2014.
- TANNOUS, B. A et al. Enhanced Gaussia luciferase blood assay for monitoring of in vivo biological processes. *Anal Chem*, n. 2, p. 1189-1192, 2011.
- TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation. *Immunol Cell Biol*, p. 201-208, 1993.
- TUMPEY, T. M. et al. Characterization of the Reconstructed 1918 Spanish Influenza Pandemic Virus. *Science*, v. 310, 2005.
- TURNER, D. et al. Systematic review and economic decision modelling for the prevention and treatment of influenza A and B. *Bmj*, 2003. doi: 326.7401.
- UEBELHOER, L. S. et al. High-throughput, luciferase-based reverse genetics systems for identifying inhibitors of Marburg and Ebola viruses. *Antiviral Research*, p. 86-94, 2014.
- URBANIAK, K. In vivo reassortment of influenza viruses. *Acta Biochim Pol*, v. 3, p. 427-431, 2014.

URBANIĄK, K.; DANIEL, I.; Markowska. In vivo reassortment of influenza viruses. *Acta Bio Polonica*, p. 427-431, 2014.

WIDJAJA, I. et al. Competition between Influenza A Virus Genome Segments. *Plos one*, v. 10, p. e47529, 2012.

WISE, H. M. et al. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*, n. 16 p. 8021-8031, 2009.

WISE, H. M. et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *Plos Pathog*, v. 8, n. 11, p. e1002998, 2012. doi: 10.1371.

WONG, W. Y. et al. A cell-based screening system for anti-influenza A virus agents. *Scientific Reports*, 2015. doi: 10.1038.

WURDINGER, T. et al. A secreted luciferase for *ex-vivo* monitoring of *in vivo* processes. *Nat Methods*, v. 2, p. 171-173, 2008.

ZHANG, J. et al. Identification of novel virus inhibitors by influenza A virus specific reporter cell based screening. *Antiviral Research*, p. 48-54, 2011.

ZHU, W. et al. A reporter system for assaying influenza virus RNP functionality based on secreted Gaussia luciferase activity. *Virology Journal*, n. 8, p. 29, 2011.