

FABIANA ABDALLA PIRES FERREIRA

PAPEL FUNCIONAL DA TIP47 NA REPLICAÇÃO DO
VÍRUS DENGUE 2 EM HEPATÓCITOS HUMANOS



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2018

Trabalho realizado no Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, UFRJ, sob a orientação da Professora Andrea Thompson Da Poian e coorientação de Julianna Dias Zeidler.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

A135p Abdalla Pires Ferreira, Fabiana
Papel funcional da Tip47 na replicação do vírus dengue 2 em hepatócitos humanos. / Fabiana Abdalla Pires Ferreira. -- Rio de Janeiro, 2018.
54 f.

Orientadora: Andrea Thompson Da Poian.
Coorientadora: Julianna Dias Zeidler.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

1. Vírus da dengue. 2. Proteína C. 3. Gotículas lipídicas. 4. Tip47. I. Thompson Da Poian, Andrea, orient. II. Dias Zeidler, Julianna, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Fabiana Abdalla Pires Ferreira**

DRE: 115051449

BANCA EXAMINADORA: Profa. Iranaia Assunção Miranda (Presidente)
Dr. Felipe Mousovich Neto
MSc. Fernanda Almeida de Oliveira
Profa. Luciana Jesus da Costa (Suplente)

Título da Monografia: **“Papel funcional da Tip47 na replicação do vírus dengue 2 em hepatócitos humanos”**

Local: **Sala I0-057/ Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **19 de dezembro de 2018 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2018.

NOTA

9,5

Banca Examinadora:

Iranaia Assunção Miranda

Profa. Iranaia Assunção Miranda

9,5

Felipe Mousovich Neto

Dr. Felipe Mousovich Neto

9,5

Fernanda Almeida de Oliveira

MSc. Fernanda Almeida de Oliveira

Profa. Luciana Jesus da Costa

Aluno:

Fabiana Abdalla Pires Ferreira

Fabiana Abdalla Pires Ferreira

Orientador:

Andrea Thompson Da Poian

Profa. Andrea Thompson Da Poian

Coorientador:

Julianna Dias Zeidler

Dra. Julianna Dias Zeidler

Coordenador
de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, por todo esforço e suporte dados até então, para que pudesse estar onde estou. Em especial às minhas irmãs Luciana e Juliana, por toda a parceria.

Agradeço aos meus avós, já falecidos, que sempre me apoiaram em absolutamente tudo na vida!

Agradeço as minhas amigas Qizetes, que me acompanham desde o Ensino Médio e as levarei para a vida toda! Obrigada por todo apoio e motivação, e apesar de termos mais afinidades dentro do nosso grupo, todas contribuem unicamente com a pessoa que sou hoje. Por sorte e privilégio, agradeço não só à elas, mas também à todos (muitos) os amigos que participam da minha vida, e também dessa graduação.

Agradeço à minha psicóloga Suely Rocha, por quem tenho muito carinho e hoje se tornou uma grande amiga! Obrigada por sempre me ajudar a ver o lado bom das coisas e das pessoas, e ser uma mulher extremamente forte.

Agradeço à Profa Andrea Da Poian, por quem tenho muita admiração, por ter me recebido tão bem em seu laboratório.

Agradeço à todos do Laboratório de Bioquímica de Vírus. Por serem uma segunda família para mim, e sempre estarem disponíveis a todos os meus (muitos) questionamentos. Agradeço em especial à Glauce, por ter sido minha primeira mãe-científica com toda sua paciência e dedicação na minha orientação. Agradeço também, à Julianna, não só pela orientação deste trabalho como também por todo aprendizado fora da bancada.

Agradeço às agências de fomento CNPq, FAPERJ e CAPES, por me proporcionarem fazer esse trabalho.

**“A ciência é uma disposição de aceitar
os fatos mesmo quando eles são opostos aos desejos.”**

Burrhus Frederic Skinner

RESUMO

O vírus da dengue (DENV) é o causador da principal arbovirose humana que atinge inúmeras pessoas anualmente, sendo um grande problema de saúde pública no mundo. A infecção pelo DENV provoca diversas alterações no metabolismo de lipídios, sendo o acometimento hepático um dos principais sintomas associados ao desenvolvimento de casos graves da doença. Estudos anteriores revelaram que a interação entre a proteína capsídica do DENV (DENVC) e gotículas lipídicas (GL) é essencial para a replicação viral. Além disso, experimentos de microscopia de força atômica demonstraram que a Tip47 ou perilipina 3 interage com DENVC *in vitro*. No entanto, ainda não se sabe se Tip47 é de fato um componente essencial para a replicação do DENV nas células hospedeiras. Com o objetivo de explorar nesse sentido, silenciámos o gene da Tip47 por meio do sistema CRISPR/Cas9 em células de hepatocarcinoma humano Huh7, gerando uma sublinhagem policlonal Huh7- Δ Tip47, que tem redução de cerca de 80% na expressão de Tip47, uma sublinhagem clonal cuja expressão de Tip47 é nula (Huh7- Δ Tip47-E7), bem como uma sublinhagem controle Huh7- Δ Scrb. Por meio de cromatografia de camada delgada (TLC), vimos que as sublinhagens Huh7- Δ Tip47 e Huh7- Δ Scrb não apresentam diferenças quanto ao conteúdo lipídico intracelular (triacilglicerol, ésteres de colesterol e diacilglicerol/colesterol livre) quando comparadas entre si e às células Huh7 parentais. No entanto, a sublinhagem clonal Huh7- Δ Tip47-E7 parece apresentar GL menores do que as células controle, o que não foi observado nas sublinhagens policlonais. Quanto aos efeitos da infecção por DENV, vimos que a expressão de Tip47 não é alterada nas células Huh7 no tempo de 24 h.p.i. (pico de replicação do DENV nessas células, tempo adotado em todos os ensaios). A sublinhagem clonal Huh7- Δ Tip47-E7, mas não a Huh7- Δ Tip47-policlonal, teve menor capacidade de produzir partículas virais viáveis e reduzida porcentagem de infecção quando comparada às células controle. Quanto ao conteúdo intracelular de lipídeos, não identificamos diferenças em nenhuma das sublinhagens infectadas com mock ou DENV. Dessa forma, concluímos que Tip47 é importante para a ótima produção de DENV em células Huh7, sendo que isso não parece estar relacionado à função da Tip47 em controlar o conteúdo lipídico das GL. Além disso, a menor taxa de proliferação observada para o clone Huh7- Δ Tip47-E7 parece não influenciar na menor replicação de DENV, uma vez que a infecção por outro vírus não relacionado, o MAYV, não foi afetada nessas células. Pode ser que alterações na morfologia de GL, o que parece ocorrer nas células depletadas para Tip47, influencie na menor produção de partículas virais nessas células. Uma outra possibilidade, nossa principal hipótese, é que as perilipinas (especialmente a Tip47) sejam determinantes para a localização de DENVC na superfície de GL, sendo essas nossas próximas investigadas.

Palavras-chave: vírus dengue; proteína C, gotícula lipídica; Tip47.

ABSTRACT

The dengue virus (DENV) is one of the main causes of human arboviruses, which affect many people annually, being an important public health problem in the world. DENV infection induces multiple changes in the metabolism of lipids and may cause hepatic disease, one of the most common problems related to the development of the severe outcomes of the disease. It was found that the interaction between DENV capsid protein (DENVC) and lipid droplets (LD) is essential to virus replication. By atomic force microscopy, it was found that Tip47 or perilipin 3 interacts with DENVC *in vitro*. However, it is still unknown if Tip47 is indeed an essential component for DENV replication in host cells. To further explore in this sense, we deleted the Tip47 gene through CRISPR/Cas9 technique in the human hepatocarcinoma cell line Huh7, generating a Huh7- Δ Tip47 polyclonal subline, which had an 80% reduction in the expression of Tip47, a clonal subline, totally depleted to Tip47, as well as a control subline Huh7- Δ Scrb. Using thin-layer chromatography (TLC), we observed that Huh7- Δ Tip47 and Huh7- Δ Scrb sublines had no differences regarding its intracellular lipid content when compared to parental Huh7 cells. Nevertheless, the clonal Huh7- Δ Tip47-E7 subline seems to present smaller LD when compared to control cells, which is not observed in the polyclonal subline Huh7- Δ Tip47. Regarding the effects of DENV infection, we observed that the expression of Tip47 is not altered in Huh7 cells 24 h.p.i. (the peak of DENV replication in these cells, condition used for all the experiments). The Huh7- Δ Tip47-E7 subline was less able to produce viable DENV particles and had reduced percentage of infection when compared to control cells. None of the sublines tested showed differences regarding its intracellular lipid content upon mock or DENV infection. Therefore, we conclude that Tip47 is important for optimal DENV replication in Huh7 cells, and it seems to be independent from the function of Tip47 in modulation the lipid content of LD. In addition, the lower proliferation rates of Huh7- Δ Tip47-E7 cells seems not to impact DENV replication by itself, as the infection of a non-related virus, MAYV, was not impaired in the same cells. Alterations in the morphology of LD, which seems to occur in Tip47-depleted cells, may influence the lower production of DENV particles in these cells. Another possibility, our main hypothesis, is that perilipins (especially Tip47) may be determinant for the localization of DENVC on the surface of LD. We aim to investigate in this sense in our next steps.

Keywords: Dengue virus, protein C, lipid droplet, Tip47.

INDICE

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Epidemiologia da dengue	11
1.2 Sintomas da dengue	12
1.3 O Vírus Dengue.....	13
1.3.1 Estrutura Viral	13
1.3.2 Replicação do DENV nas células hospedeiras.....	15
1.4 DENV e o metabolismo lipídico.....	16
1.5 Gotículas lipídicas (GL)	19
1.6 Perilipinas.....	21
2 JUSTIFICATIVAS	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo principal.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Geração de sublinhagens estáveis deletadas para Tip47.....	25
4.2 Cultura de Células	26
4.3 Extração de proteínas e Western Blot	26
4.4 Extração de RNA	27
4.5 Transcrição Reversa.....	28
4.6 PCR quantitativo	29
4.7 Titulação Viral.....	29
4.8 Imunofluorescência	30
4.9 Extração de lipídeos e cromatografia em camada delgada (TLC).....	30
4.10 Expressão da proteína C do DENV (DENVC) em bactérias	31
4.11 Purificação de DENVC	32
4.12 Produção de anticorpo contra proteína C do DENV	33
4.13 Análises estatísticas.....	34
5 RESULTADOS.....	34
5.1. Avaliação da eficiência do sistema CRISPR/Cas 9.....	34
5.2 Perfil lipídico das células crispadas.....	36
5.3 Efeitos da infecção pelo DENV nas sublinhagens Huh7 controle e deletadas para Tip47	39

5.3.1 Efeitos da infecção pelo DENV na expressão de Tip47	39
5.3.2 Efeitos da deleção de Tip47 na replicação do DENV em células Huh7 .	40
5.4 A deleção de Tip47 não reduz a replicação do vírus mayaro (MAYV) em células Huh7.....	45
5.5 Localização da DENVC em células Δ Tip47	47
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÕES	52
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da dengue

Atualmente, a dengue é considerada uma doença endêmica em mais de 100 países, sendo as regiões das Américas, do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental as mais afetadas (*World Health Organization*, 2009) (**Figura 1**). Em 2012, estimou-se que 3,9 bilhões de pessoas em 128 países estivessem em risco pela infecção do vírus da dengue (Brady *et al.*, 2012). Estes são apenas números aproximados, pois existe uma grande discrepância entre a estimativa oferecida por grupos acadêmicos e a estimativa de notificações à OMS. Essa diferença se deve principalmente ao fato de muitos casos ainda hoje não serem notificados (*World Health Organization*, 2009).

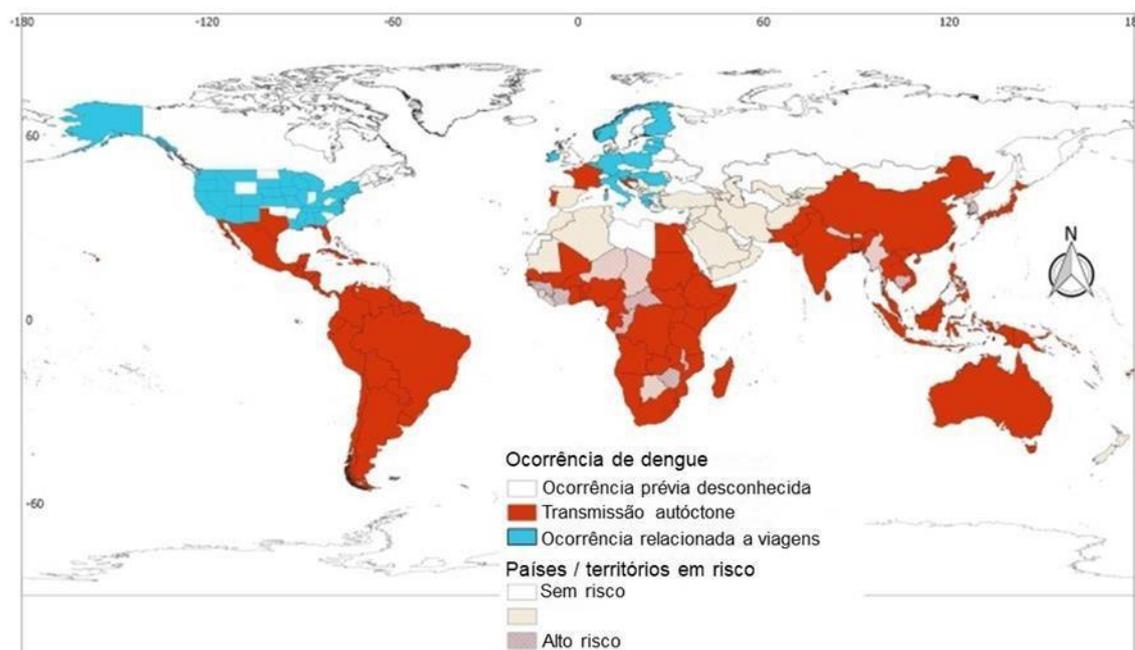


Figura 1 – Ocorrência da dengue. O gráfico mostra a distribuição global da dengue que corresponde ao risco global da doença. A dengue é considerada endêmica em diversas regiões das Américas, África, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (Leta *et al.*, 2018).

Muitos fatores contribuíram para que a dengue se tornasse epidêmica como, por exemplo, a globalização e urbanização, mas principalmente a falta de um controle eficaz do vetor. O vírus se adaptou muito bem ao ciclo de transmissão humano- *Aedes aegypti* - humano nos grandes centros urbanos, onde a população humana tem grande contato com a população de mosquitos. Esse panorama favorece cada vez mais a manutenção do

vírus e geração de novas cepas, tornando o combate à dengue ainda mais difícil (Gubler, 2011).

No Brasil, em 2018, até a realização da Semana Epidemiológica no mês julho, foram registrados 187.830 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 90,5 casos a cada 100 mil habitantes, sendo confirmados 56% dos casos (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2018). A região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos prováveis (36%) em relação ao total do país, seguida pelas regiões Sudeste (29%), Nordeste (26%), Norte (6,2%) e Sul (1,2%).

Até o fim do primeiro semestre de 2018, foram confirmados 191 casos de dengue grave e 2.098 casos de dengue com sinais de alarme. Enquanto que no mesmo período de 2017 foram confirmados 237 casos graves e 2.389 casos com sinais de alarme. Dessa forma, esses números só reforçam que os estudos e pesquisas a respeito da doença são essenciais para combate do vetor e desenvolvimento de tratamentos.

1.2 Sintomas da dengue

A dengue é uma doença sistêmica e dinâmica que apresenta manifestações clínicas de amplo espectro. Quando há presença de sintomas, a dengue poderá ser classificada em três formas. A primeira delas é a dengue clássica caracterizada por uma febre alta repentina acompanhada de rubor facial, eritema da pele, mialgia e dor de cabeça. Esse quadro clínico inicial pode ser de difícil distinção entre outras doenças. Em caso de progressão da doença, a dengue será classificada como dengue hemorrágica, apresentando manifestações clínicas como petéquias, progressiva diminuição de células brancas e plaquetas. Por fim, a dengue pode ser classificada em síndrome do choque da dengue, em que o sintoma característico é o choque hipovolêmico decorrente da perda de volume do plasma através de seu extravasamento para os tecidos, sendo acompanhado de falência circulatória, que pode levar à morte do paciente (*World Health Organization*, 2009).

A maioria dos pacientes se recupera rapidamente da doença não severa, mas uma parcela progride para a doença grave, que é caracterizada principalmente pelo extravasamento do plasma, com ou sem hemorragia. Após o período de incubação (4-10 dias), a doença começa de forma abrupta, sendo o curso clínico dividido em três fases: fase febril, crítica e de recuperação (*World Health Organization*, 2009) (**Figura 2**).

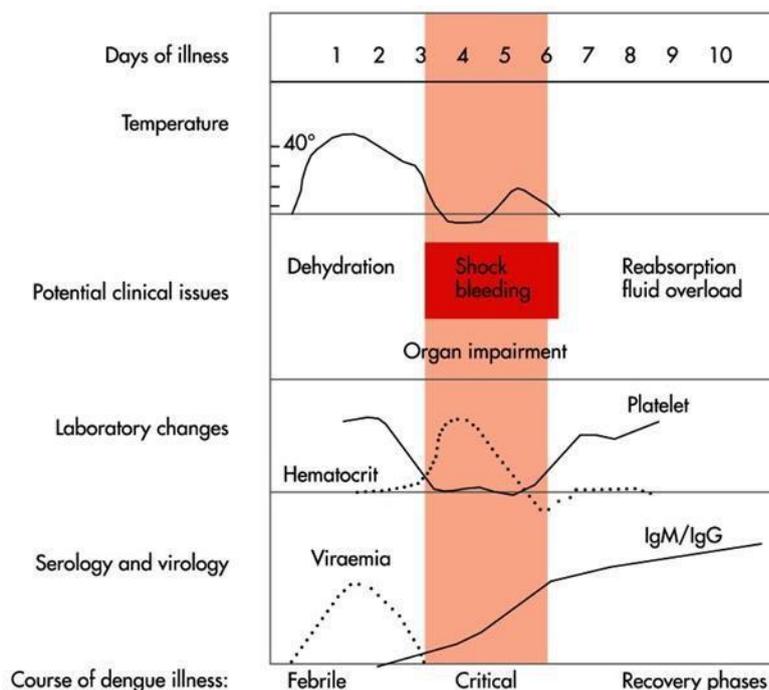


Figura 2 – Curso clínico da dengue. A sintomatologia da doença é dividida em três fases: fase febril, fase crítica e fase de recuperação. O gráfico apresenta essas três fases e alguns critérios importantes para avaliar a sintomatologia (World Health Organization, 2009).

Evidências clínicas demonstraram importantes alterações hepáticas durante a infecção pelo DENV. Os estudos realizados em pacientes post-mortem, demonstraram esse comprometimento do fígado, como por exemplo, a presença de hepatomegalia com focos hemorrágicos (Leong *et al.*, 2007). Além disso, foram descritos quadros esteatose hepática, que é caracterizado principalmente pelo acúmulo de lipídios no fígado (Póvoa *et al.*, 2014). Os quadros de acometimento hepático devido a infecção pelo DENV estão associados a pacientes que desenvolveram a forma mais grave da doença, como a febre hemorrágica e casos de hepatite fulminante.

1.3 O Vírus Dengue

1.3.1 Estrutura Viral

O DENV é membro do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Existem quatro diferentes sorotipos do DENV (DENV 1 a 4) (Zeidler *et al.*, 2017). Seu genoma é constituído por uma fita simples de RNA senso positiva traduzida por uma única fase aberta de leitura, resultando em uma poliproteína associada à membrana do retículo endoplasmático. Essa poliproteína é clivada por proteases virais e celulares e origina as

três proteínas estruturais do vírus (proteína C, prM, E) e sete proteínas não- estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (**Figura 3A**). A estrutura do vírus é composta por nucleocapsídeo, formado pela interação da proteína C com o genoma, envolto por uma bicamada lipídica constituída pelas proteínas de membrana (M) e envelope (E) (**Figura 3B**).

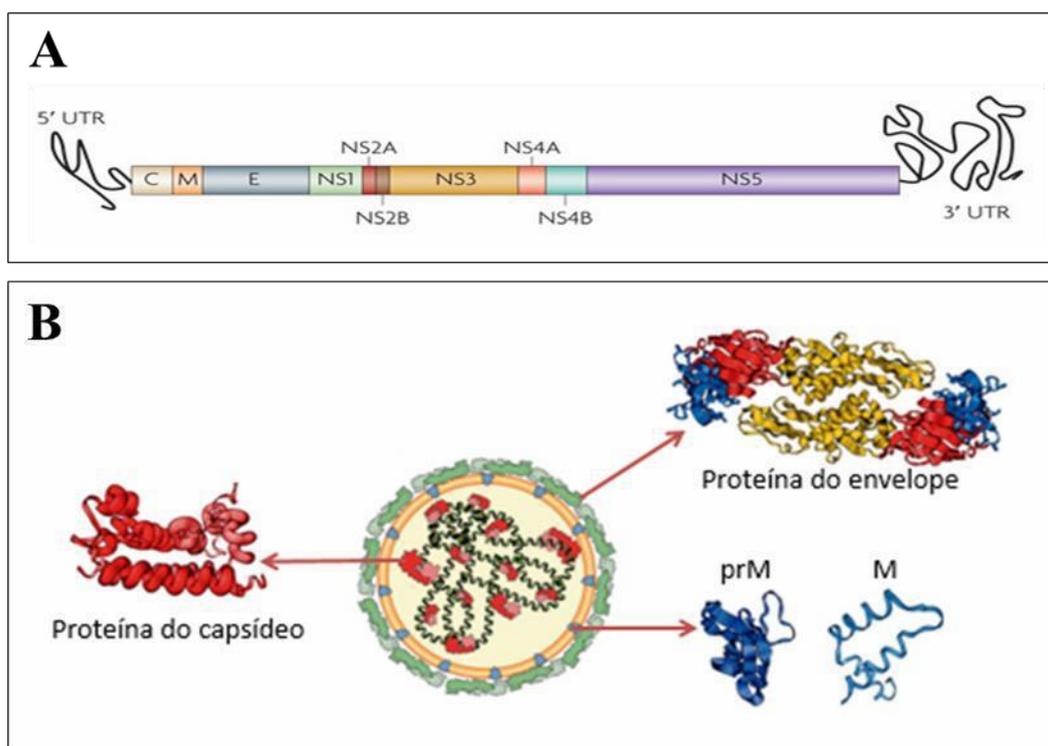


Figura 3 – (A) Representação do genoma do DENV. Proteínas estruturais (capsídica, membrana e envelope) e não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) codificadas pelo RNA viral (Guzman *et al.*, 2010). **(B) Esquema representativo da estrutura do DENV**, composto por um envelope lipídico constituído por proteínas do envelope (E) e proteínas de membrana (M), envolvendo o nucleocapsídeo formado pelo RNA viral associado à proteína C (adaptado de Cruz-Oliveira *et al.*, 2015).

A proteína C (DENVC) é uma proteína estrutural do vírus dengue altamente básica, cuja forma monomérica é composta por 4 α -hélices ($\alpha 1$ a $\alpha 4$) que, quando em solução, apresenta-se como homodímero (Jones *et al.*, 2003). A distribuição de cargas dessas α -hélices é essencial para a interação da proteína C com membranas lipídicas e com o RNA viral (Ma *et al.*, 2004). Sugere-se que a região hidrofóbica da proteína (hélice $\alpha 2$) interaja com membranas fosfolipídicas, e a região rica em resíduos básicos (hélice $\alpha 4$), se associe ao RNA viral. Foi demonstrado que durante a infecção, DENVC

se localiza na superfície de gotículas lipídicas (GL) e que isso é fundamental para a replicação do DENV nas células hospedeiras (Samsa *et al.*, 2009).

1.3.2 Replicação do DENV nas células hospedeiras

A ligação do vírus dengue à célula alvo é mediada pela proteína de envelope (E) e ocorre por proteínas celulares de ancoramento que possuem afinidade sorotipo-específica com o DENV. A entrada do vírus pode depender de endocitose mediada por clatrina, dependendo do sorotipo do vírus que infectará a célula (Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). Após a formação da vesícula endocítica ocorre acidificação do lúmen do endossoma, o que permite a fusão da membrana endossomal com o envelope viral (Gerold *et al.*, 2017) (**Figura 4**). Após a entrada do nucleocapsídeo no citoplasma da célula, o genoma viral é desmontado, o RNA viral é traduzido e a poliproteína processada (Diamond e Pierson, 2015). O RNA viral sintetizado interage com a proteína C formando o novo nucleocapsídeo que brotará para o retículo endoplasmático, adquirindo o seu envelope lipídico. A partícula viral formada é liberada para fora da célula por meio de exocitose (Gerold *et al.*, 2017).

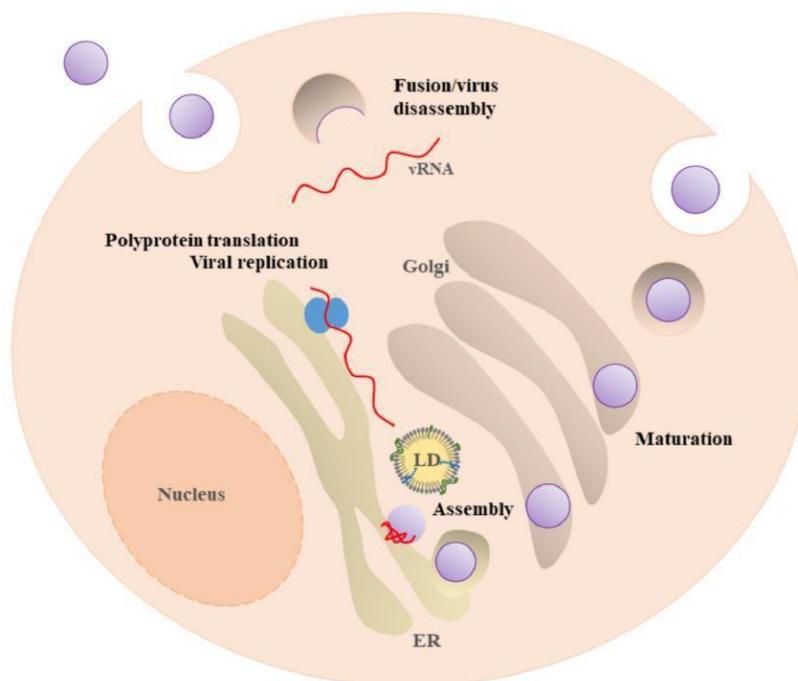


Figura 4 - Ciclo de vida de flavivírus. Os vírus são internalizados na célula hospedeira por endocitose mediada por receptor. A acidificação dos endossomas leva à fusão de proteínas virais e celulares; o capsídeo viral é desmontado, liberando o RNA viral no citoplasma. O RNA viral é traduzido em um poliproteína. No retículo endoplasmático, as proteínas virais são traduzidas pelos ribossomos da célula hospedeira. A replicação e montagem dos novos vírus ocorre próximo ao retículo endoplasmático e GL. As partículas virais formadas são liberadas da célula através da via secretória (Figura extraída de Martins *et al.*, 2018).

1.4 DENV e o metabolismo lipídico

A relação da infecção pelo DENV e o metabolismo lipídico vem sendo cada vez mais estudada. Alguns trabalhos demonstram que a infecção modula o metabolismo lipídico celular como, por exemplo, foi visto que a localização celular da enzima ácido graxo sintase (do inglês FAS, *Fatty Acid Synthase*), uma das principais enzimas envolvidas na síntese de lipídios, é alterada em células infectadas pelo DENV, sendo ela recrutada para sítios de replicação viral pela proteína não-estrutural 3 (NS3) (Heaton *et al.*, 2010). Além do recrutamento de FAS, a NS3 estimula a atividade dessa enzima. Foi visto também que durante a infecção pelo DENV, quando a FAS é inibida com C75

(inibidor específico dessa enzima), observa-se uma diminuição no número de GL e da replicação viral (Samsa *et al.*, 2009; Heaton *et al.*, 2010). Estudos do nosso grupo demonstraram que as células infectadas pelo DENV apresentam maior dependência do metabolismo mitocondrial oxidativo, sendo os ácidos graxos o principal substrato energético utilizado, fornecendo assim energia necessária para a replicação do vírus (Fernandes-Siqueira *et al.*, 2018). Além disso, é descrito também que a lipofagia é aumentada durante a infecção pelo DENV, sendo dessa forma disponibilizados ácidos graxos para β -oxidação nessa condição (Jordan e Randall, 2017). Estes resultados são indicativos de que alterar o metabolismo de lipídios possa ser uma forma de bloquear a replicação o DENV.

Quando infectadas pelo DENV, diversas células apresentam um aumento no número de GL e DENVC se acumulam na superfície dessas organelas (Samsa *et al.*, 2009; Carvalho, *et al.*, 2011) (**Figura 5**). O mesmo estudo demonstrou ainda que existem aminoácidos específicos da hélice $\alpha 2$ que participam da interação entre DENVC e GL. Além disso, foi sugerido que a proteína Tip47 (do inglês, *Tail-Interacting Protein of 47 Kd*) é responsável pela a interação da DENVC com GL, sendo essa interação dependente de altas concentrações de cloreto de potássio (KCl) (Carvalho *et al.*, 2011).

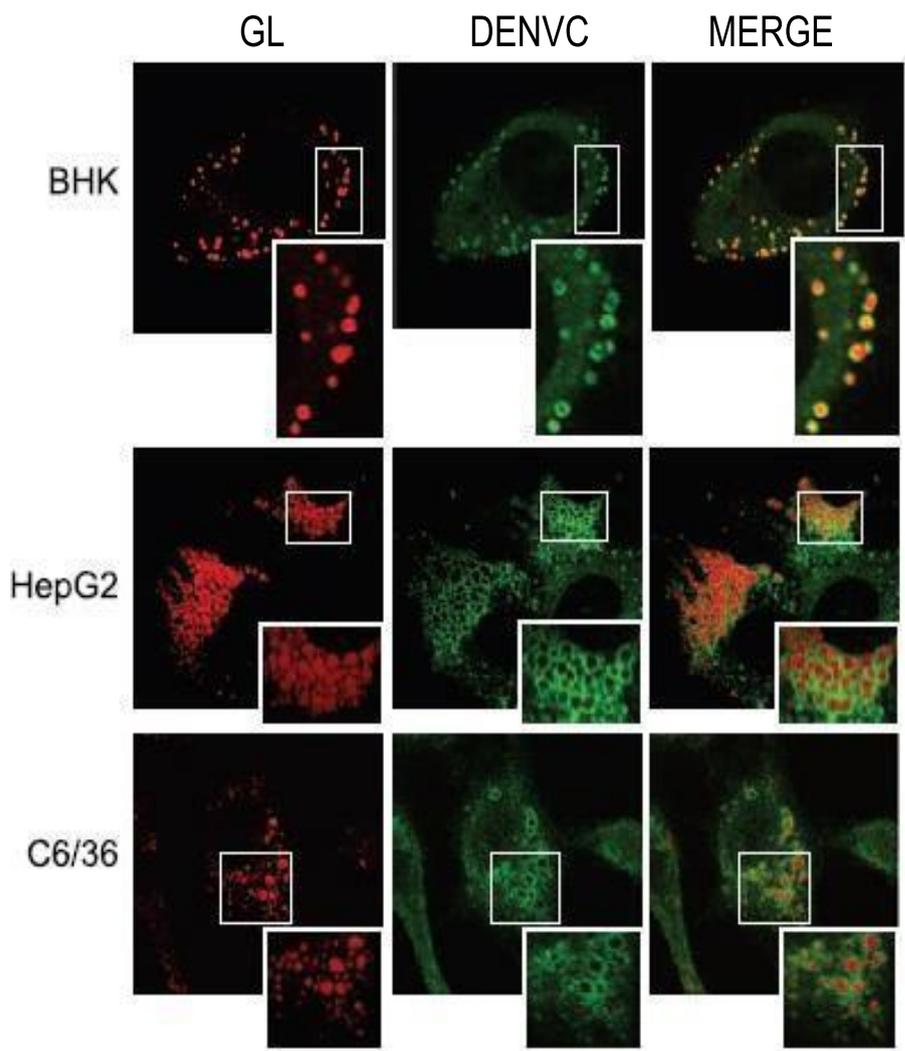


Figura 5: Interação das GL e DENVC em células BHK, HepG2, C6/36. Por microscopia confocal, foi visto que a proteína capsídica do DENV (DENVC) se acumula na superfície de GL em células infectadas (Samsa *et al.*, 2009).

A bomba Na^+/K^+ ATPase é um transportador de íons de membrana plasmática que catalisa o transporte de K^+ dependente de ATP em troca de Na^+ . Com isso, promove maiores concentrações de K^+ no meio intracelular, enquanto que Na^+ terá baixas concentrações fora da célula. Diferentemente das células não tratadas, em que foi visto o padrão de localização da proteína C na superfície das GL, células tratadas com ouabaína, inibidor de bombas Na^+/K^+ ATPase, apresentaram uma distribuição da proteína C pelo citosol, sugerindo que houve a liberação de proteína C das GL, o que resultou na diminuição significativa do número de partículas virais liberadas pela célula (Carvalho *et al.*, 2011). Quanto maior as concentrações de ouabaína, maior era a inibição da produção de partículas virais infecciosas. Apesar da diminuição na produção e liberação

de partículas, não foram encontradas diferenças na quantidade de RNA viral sob tratamento com ouabaína. Esses experimentos demonstram a dependência da localização da DENVC na superfície de GL para montagem de partículas virais.

Por ensaios de microscopia de força atômica, foi demonstrado que DENVC interage com perilipinas presentes na superfície de GL (Carvalho *et al.*, 2011). Anticorpos específicos para cada perilipina foram capazes de bloquear a interação entre DENVC e GL, sendo que o anticorpo contra perilipina 3 (Tip47) o que apresentou maior efeito inibitório (43%) no rompimento da interação entre DENVC e essa organela. Sendo assim, especulamos que a interação entre a DENVC e Tip47 seja importante para sua localização na superfície das GL e para a replicação do vírus nas células hospedeiras.

1.5 Gotículas lipídicas (GL)

As GL são organelas intracelulares derivadas do retículo endoplasmático que armazenam lipídios neutros, predominantemente os triglicerídeos e ésteres de colesterol (Melo *et al.*, 2011). O armazenamento desses lipídios permite que eles sejam utilizados a longo prazo, de acordo com a necessidade celular, para a geração de energia e de componentes de membrana. Hoje se sabe que as GL possuem diversas funções como no metabolismo de lipídios, sinalização celular e inflamação. As GL podem também exercer função protetora como o sequestro de lipídios tóxicos, que, ao serem incorporados nas GL, se tornam inofensivos (Welte, 2015).

Nas GL, os lipídios neutros são envolvidos por uma monocamada de fosfolipídios, principalmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. Além disso, as GL possuem proteínas presentes em sua superfície, as quais podem direcionar a geração de diferentes gotículas em termos de tamanho e composição lipídica dentro de uma mesma célula (Wilfling *et al.*, 2014) (**Figura 6A**). Essas proteínas são membros da família PAT (Perilipina, Adipofilina e TIP47). Elas são descritas como proteínas associadas constitutivamente a lipídios (CPATs) ou proteínas de ligação a lipídios (EPATs) e desempenham importante papel na regulação do armazenamento de lipídeos, prevenindo sua hidrólise desregulada e atuando também na própria estabilização das GL (Skinner JR *et al.*, 2009). Além das perilipinas, existem outras proteínas presentes, em menor número, que associam-se as GL, como as proteínas GTPases da família Rab, que são consideradas reguladores críticos de tráfego vesicular, e interação entre organelas (Melo *et al.*, 2011).

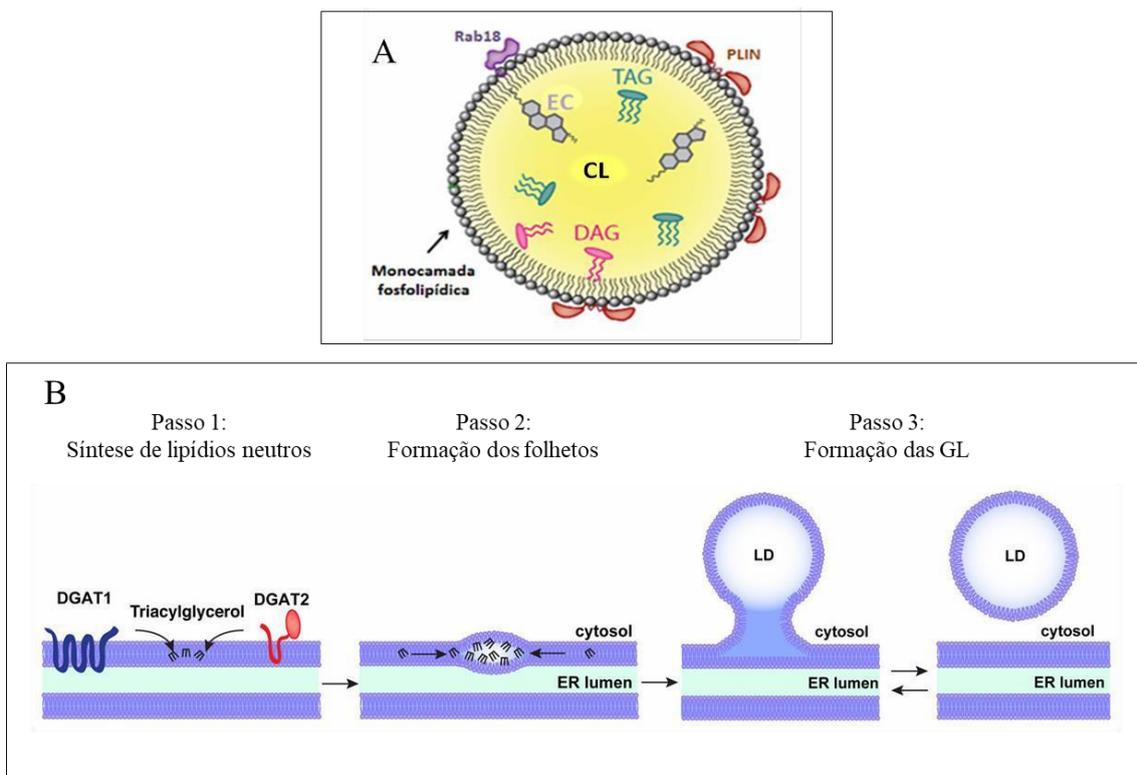


Figura 6: (A) Esquema representativo da composição de GL. Núcleo contendo lipídios neutros, predominantemente TAG (triacilglicerol) e EC (ésteres de colesterol), envolto pela monocamada fosfolipídica com as proteínas de superfície associadas (adaptado de Saka e Valdivia, 2012). (B) Representação hipotética do processo de formação das GL. O acúmulo de lipídios neutros entre os folhetos do retículo endoplasmático promovem a liberação das novas organelas (Wilfling *et al.*, 2014).

O processo de formação das GL ainda não é bem elucidado, porém a hipótese que é mais bem aceita sugere que esses lipídios neutros se acumulam entre os folhetos do retículo endoplasmático e, à medida que aumentam de tamanho, se tornam mais instáveis e acabam brotando do retículo, originando assim novas organelas (**Figura 6B**) (Wilfling *et al.*, 2014). Diversos patógenos utilizam as GL durante a infecção. O vírus da Hepatite C (HCV), por exemplo, as utiliza como plataforma para montagem de partículas virais (Saka e Valdivia, 2012). Além disso, estudos já demonstraram que a Tip47 (perilipina 3) atua como um regulador celular da replicação de RNA do HCV. A proteína não estrutural 5 (NS5A) do HCV forma um complexo com a Tip47 (perilipina 3) e esse complexo tem como alvo o novo RNA viral que é sintetizado (Vogt, et al., 2013). Além dos vírus, muitos patógenos microbianos induzem o acúmulo de GL em células do sistema imunológico como neutrófilos e macrófagos, gerando alterações morfológicas nessas células. São exemplos disso, as bactérias do gênero *Chlamydia* que

realizam a translocação de GL do citoplasma do hospedeiro para o lúmen do vacúolo parasitóforo, e do gênero *Mycobacterium*, que utilizam as GL do hospedeiro como fonte nutricional (Saka e Valdivia, 2012).

Semelhante ao que ocorre com o DENV, foi descrito que durante a infecção pelo ZIKV a proteína C do Zika (ZIKVC) apresenta um padrão de localização em torno das GL, sendo que existem aminoácidos específicos da hélice- $\alpha 1$ que são responsáveis pela associação da proteína com a membrana das GL (Shang *et al.*, 2018).

1.6 Perilipinas

As proteínas pertencentes à família PAT (perilipina 1, adipofilina e Tip47) foram mais recentemente reclassificadas como membros da família das perilipinas após a descoberta de dois outros membros. As cinco proteínas dessa família possuem alta similaridade em suas sequências e capacidade de associação com GL. Elas são proteínas de superfície das GL que atuam no processo de formação e estabilização dessas organelas, apresentando distribuição tecido-específica (**Figura 7**) (Kimmel *et al.*, 2009).

A PLIN1 (perilipina 1) é uma das principais proteínas associadas ao tecido adiposo branco e é expressa em adipócitos maduros. Sua fosforilação é dependente de PKA (proteína kinase A) e atua na regulação da hidrólise de TAG (Itabe *et al.*, 2017). Já a PLIN2 (perilipina 2 ou adipofilina), está relacionada à diferenciação de adipócitos, sendo responsável pelo acúmulo de lipídios, principalmente no fígado. A PLIN3 (perilipina 3 ou Tip47), é ubiquamente expressa e, por isso, contribui na formação proteica da grande maioria das GL. Ela se apresenta estável no citoplasma das células, onde atua no tráfego de proteínas lisossomais, mas também se associa à membrana das GL que estão em formação e auxiliam na incorporação de TAG (triacilgliceróis) a fim promover seu armazenamento (Brasaemle e Wolins, 2012). A PLIN4 (perilipina 4) atua na formação das GL, principalmente em adipócitos, sendo que durante a diferenciação dessas células a PLIN2 é substituída pela PLIN4. A PLIN5 (perilipina 5), predominantemente expressa em tecidos musculares, principalmente miocárdio, foi descrita como importante na interação de GL e mitocôndrias, desempenhando papel no fornecimento de energia para as células e regulando a β -oxidação de ácidos graxos nesses tipos celulares (Itabe *et al.*, 2017).

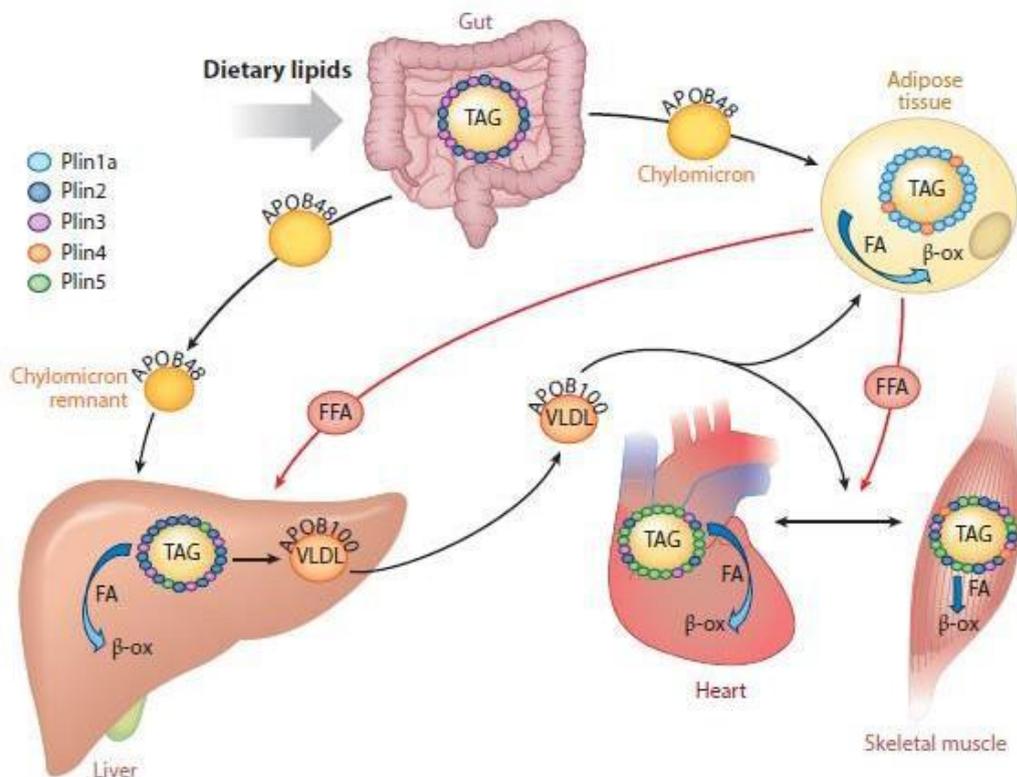


Figura 7: Esquema representativo da expressão tecido-específica das 5 isoformas de perilipinas. A perilipina 1 é exclusivamente expressa no tecido adiposo; perilipina 2 é expressa no intestino, músculo cardíaco, esquelético, e majoritariamente encontrada no fígado; perilipina 3 é ubiquamente expressa; perilipina 4 está presente no tecido adiposo e no músculo esquelético; perilipina 5, encontra-se expressa no músculo cardíaco, esquelético, e no fígado (Kimmel *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVAS

Sendo a dengue uma doença de grande importância na saúde pública em vários países do mundo, um melhor entendimento dos aspectos celulares e moleculares associados à infecção pelo DENV faz-se necessário. Devido à ocorrência de acometimento hepático nas fases mais severas do dengue e, considerando que o fígado desempenha um importante papel no metabolismo lipídico do organismo, optamos por usar hepatócitos como modelo para a avaliação de alterações no metabolismo lipídico durante a infecção pelo DENV, mais especificamente quanto ao papel desempenhado pela perilipina Tip47 na produção de partículas virais viáveis. Estudos nesse sentido contribuirão para o esclarecimento de aspectos na interação vírus-célula, elucidando possíveis alvos de intervenção terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Investigar a dependência e a função de Tip47 na produção de DENV em hepatócitos humanos da linhagem Huh7.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as sublinhagens Huh7- Δ Tip47 (que possuem o gene da Tip47 deletado por meio do sistema CRISPR/Cas9) quanto ao conteúdo lipídico e morfologia de GL;
- Avaliar se a ausência de expressão de Tip47 em Huh7 afeta a produção de partículas de DENV2;
- Investigar se há alteração no conteúdo lipídico de Huh7- Δ Tip47 infectadas por DENV2 e se isso poderia explicar possíveis alterações na replicação do vírus em hepatócitos humanos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Geração de sublinhagens estáveis deletadas para Tip47

A linhagem celular derivada de hepatocarcinoma humano (Huh7) teve o gene da Tip47 silenciado por meio do sistema CRISPR/Cas9 utilizando-se vetores lentivirais. Essas sublinhagens haviam sido estabelecidas anteriormente em nosso laboratório e foi cedida por Julianna Zeidler para realização deste trabalho. Para a produção de vetores lentivirais, células HEK293T sofreram co-transfecção com os plasmídeos psPAX2, pCMV-VSVG e pLentiCRISPR contendo como inserto um gRNA aleatório (para gerar a origem da sublinhagem controle Δ Scrb) ou o gRNA para Tip47 utilizando o reagente de transfecção Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O sobrenadante dessas células contendo os vetores lentivirais foi coletado 24h e 48h após a transfecção e utilizado para transduzir a célula alvo, Huh7, com a adição de polibreno a 10 μ g/ml como adjuvante. 24h após a transdução, as células Huh7 sofreram seleção com o antibiótico puromicina a 5 μ g/ml, estabelecendo-se assim sublinhagens policlonais estáveis controle (Huh7- Δ Scrb) e sublinhagens cujo gene da Tip47 foi deletado em cerca de 20% das células (Huh7- Δ Tip47 policlonal). O silenciamento por meio de CRISPR/Cas9 pode não ser 100% eficiente porque a técnica se baseia na clivagem de um pequeno pedaço do genoma correspondente ao início do gene a ser silenciado, alterando assim a fase aberta de leitura (do inglês, *open reading frame*, ORF) do mesmo, sendo que ocasionalmente em algumas células a ORF não é alterada e por isso elas expressam uma proteína truncada que pode ou não ser funcional. Com isso, optamos por gerar sublinhagens clonais a partir da policlonal com o objetivo de obter células que apresentassem expressão nula de Tip47. Essa sublinhagem clonal foi gerada a partir de diluições em placa até obtermos uma célula por poço (**Figura 8**).

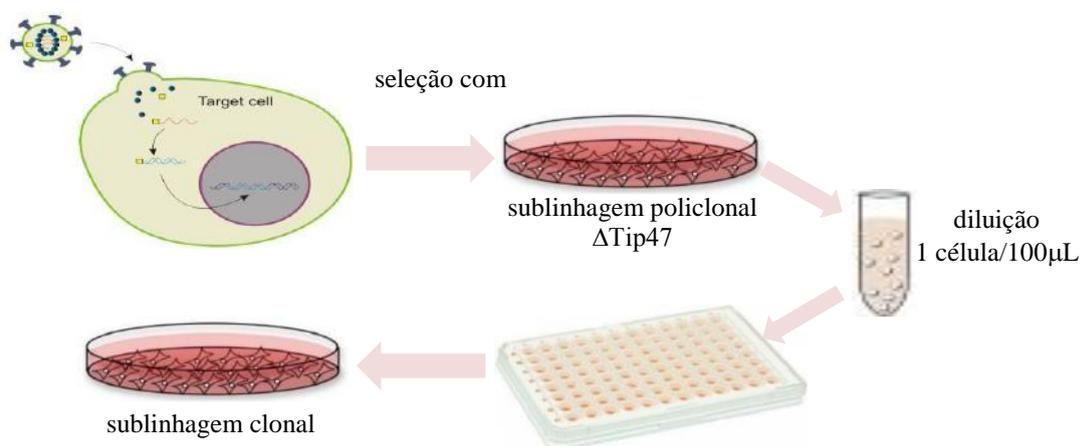


Figura 8 - Esquema representativo da obtenção de sublinhagens estáveis de Huh7 através do sistema CRISPR/Cas9. Através da utilização do vetor lentiviral, as células foram transduzidas e selecionadas com puromicina, dando origem as sublinhagens policlonais e clonais de Huh7 cujo gene da Tip47 foi deletado.

4.2 Cultura de Células

A linhagem celular de hepatocarcinoma humano (Huh7), as sublinhagens de células controle (Δ Scrb) e deletadas para o gene da Tip47 (policlonal e clone E7) foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) em 10% de soro fetal bovino (SFB) com os antibióticos, penicilina (60 mg/L) e estreptomicina (100 mg/L). Para manutenção, as células foram lavadas com PBSA (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ anidro; KH₂PO₄ 1,5 mM; – solução com pH 7,2), tratadas com tripsina e, após se destacarem da placa, foram ressuspensas em DMEM com 10% de SFB, para então serem distribuídas em garrafas ou placas, as quais são mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

4.3 Extração de proteínas e Western Blot

Células foram distribuídas em placas de 100 mm (Corning Inc., Corning, NY, EUA) em meio completo e estas deixadas crescer até atingirem a confluência desejada. As células foram lavadas 2 x em PBS (KCl 2,7 mM; NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ anidro 8 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; CaCl₂•2H₂O 0,68 mM; MgCl₂•6H₂O 0,49 mM – solução com pH 7,2) gelado e lisadas com o tampão de lise (Hepes 20mM; NaCl 150mM; MgCl₂ 1,5mM; EDTA 1Mm;pH=7,4, Glicerol 10%; Triton1%) contendo coquetel de inibidor

de proteases (10µl a cada 10^7 células). As células foram raspadas das placas e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante aliqotado e guardado em freezer a -20°C. Uma alíquota foi reservada para dosagem de proteína através do método de Lowry, em que é medida a absorbância das amostras a 660 nm e feita uma curva padrão com BSA. O método se baseia na reação de Biuret, em que as ligações peptídicas reagem com o cobre em condições alcalinas e o cobre reage com o reagente de Folin. Apesar da reação Folin-Ciocalteau não ser muito elucidada, sabe-se que a oxidação de aminoácidos aromáticos pelo cobre resulta em uma cor azul forte, que pode depender do conteúdo de tirosina e triptofano (Jakob H. Waterborg, 2012).

Uma vez quantificadas, cerca de 100 µg de proteína foi aplicado em gel de SDS-poliacrilamida (10-15%) e corrido em eletroforese a 60 V por 1h. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C extra), que foi bloqueada por 1h em leite desnatado a 5% e posteriormente submetida a ligação com anticorpo primário (1:1000 em TBS a temperatura ambiente ou a 4°C) por pelo menos 1h (o tempo ideal varia com o anticorpo) e lavadas três vezes de 10 minutos em TBS-T (10mM Tris base pH 8,0; 150mMNaCl 0,1%; 0,1 % Tween-20) sob agitação. Logo em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo (IRDye® 700/800 – LI-COR) diluído 1:2000 por 1h em TBS-T a temperatura ambiente, sendo lavadas por mais três vezes de 10 minutos em TBS-T sob agitação. A membrana foi revelada no scanner *Odyssey* (LI-COR) que possui dois canais de fluorescência, sendo um de 700nm e outro de 800nm. O canal de fluorescência em que a membrana foi revelada foi o que excita o fluoróforo conjugado ao anticorpo secundário. A quantificação densitométrica das bandas foi realizada com auxílio do software fornecido pela LI-COR (Image Studio Lite 4.0). Para cada amostra, o sinal de background foi subtraído no próprio software.

4.4 Extração de RNA

Células foram distribuídas em placas de 60 mm (Corning Inc., Corning, NY, EUA) e, após atingirem a confluência desejada, a extração de RNA foi feita segundo protocolo sugerido pelo fabricante (*Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit - GE Healthcare*). Foi adicionado 350 µl da solução de lise do kit e 3,5µl de β-Mercaptoethanol para que as células sejam lisadas e raspadas. O homogenato foi transferido para um tubo de coletor (fornecido pelo kit) e submetido a uma

centrifugação de 5.000g por 1 minuto. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em PBS, e, logo em seguida, foi realizada mais uma centrifugação de 5.000g por 1 minuto, sendo o sobrenadante novamente descartado. Foi adicionado ao pellet 350 µl da solução de lise e 3,5 µl de β-Mercaptoethanol, ressuspensionando bem para ocorrer a lise celular por completo. O lisado foi filtrado através de *RNAspin Mini Filter* que foi colocado em outro tubo de coletor e levado para uma centrifugação de 11.000g por 1 minuto. O filtrado foi transferido para outro tubo, onde foram adicionados 350 µl de etanol 70% e misturados com o auxílio do vortex (2x de 5 segundos). O lisado foi ressuspensionado e transferido para a *RNAspin Mini Column* para ser centrifugado a 8.000g por 30 segundos. Foram adicionados 350 µl do *Desalting Buffer* e centrifugados a 11.000g por 1 minuto, seguido pelo descarte do filtrado presente no tubo de coleta. Para a digestão do DNA, foi preparada uma mistura contendo 10 µl de DNase I e 90 µl de *DNase Reaction Buffer*. Após esse preparo, foi adicionado 95 µl dessa mistura no centro da membrana de sílica (presente na coluna). O tubo de coleta contendo o tubo da coluna foi deixado a temperatura ambiente por 15 minutos. Foi realizada a primeira lavagem com a adição de 200 µl de tampão de lavagem I à coluna, e centrifugação de 11000g por 1 minuto. Nesse momento, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor. Para a segunda lavagem, foram adicionados 600 µl do tampão de lavagem II à coluna, sendo a amostra centrifugada a 11.000g por 1 minuto. O filtrado foi descartado para a terceira lavagem com 250 µl de tampão de lavagem II e centrifugação de 2 minutos a 11.000g. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Por fim, foi feita a eluição do RNA pela adição de 30 µl de H₂O *RNAse-free* ao centro da coluna, sendo esta centrifugada por 1 minuto a 11000g. O RNA eluído foi armazenado imediatamente a -20°C (no caso da utilização a curto prazo) ou a -80°C (utilização a longo prazo).

4.5 Transcrição Reversa

Para a realização da reação de transcrição reversa, foi utilizado o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* da *Applied Biosystem*. Inicialmente, foi preparado o *master mix* contendo 1X do tampão da enzima, 4 mM de dNTP, 1X de *random primers* e 1x da transcriptase reversa (MultiScribe) e 1 ou 2 µg de RNA no volume final de 20 µl completando-se com água livre de nucleases. A reação foi

realizada incubado as amostras a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos em termociclador. O cDNA resultante foi imediatamente submetido à reação de PCR ou armazenado a 20°C até o uso.

4.6 PCR quantitativo

Primers para PCR quantitativo de *Tip47* (*Forward* 5'-CCCAACCTACCACGCAGTAA-3'; *Reverse* 5'-CATCCAGGGATGTGGCGATG-3') foram desenhados com a ferramenta *PickPrimers* (NIH-NCBI) de forma a amplificar produto de 90 pb. Os dados de expressão de RNAm foram normalizados para a expressão de RPL19 (*Ribosomal protein 19*, *Forward* 5'-TGGGCTGATCATCCGCAAGCC-3'; *Reverse* 5'-CCCATGTGCCTGCCCTTCCG-3'). Para cada reação de PCR, foi adicionado o mix do kit SYBR® GREEN PCR Master Mix (10µL *AppliedBiosystems*), o produto da reação de transcrição reversa (50 ng de cDNA da RT) e *primers forward* e *reverse* a 300 nM. As amostras foram submetidas a 40 ciclos de desnaturação (95°C, 15 seg), de anelamento e de polimerização (60°C, 60 seg) em um termociclador apropriado (*StepOnePlus*, *AppliedBiosystems*). Os dados foram coletados pelo programa *StepOne* (*AppliedBiosystems*). Para cada reação foi determinada a eficiência dos primers no programa LinRegPCR (versão 12.17). Para quantificação relativa dos dados obtidos, utilizamos o método de Pfaffl (Pfaffl 2001).

4.7 Titulação Viral

A titulação dos diferentes estoques virais foi realizada em placas de 24 poços semi-confluentes contendo células PS (*Porcine Stable Cell*), em que o plaqueamento foi realizado 48h antes da titulação. Uma alíquota de 50 µL de amostra foi submetida a diluições seriadas (10 x). As placas de 24 poços com PS receberam alíquotas de 150 µL de cada uma das diluições por poço, conferindo a cada diluição uma duplicata. Após a incubação por 1 hora, foi adicionado 1mL por poço de meio D-MEM 2X suplementado com 1% de SFB e 50% de carboximetilcelulose 2% (CMC), sendo as placas incubadas por 5 dias em estufa na presença de 5% de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação, as células são fixadas com 5% de formaldeído e a monocamada de células corada com solução de cristal violeta 1% para que os plaques pudessem ser visualizados e

posteriormente quantificados. Os resultados foram representados em unidades formadoras de plaques (UFP) por mL.

4.8 Imunofluorescência

Células foram distribuídas sobre lamínulas em placa de 12 poços (9×10^4 células/poço). No dia seguinte, foram fixadas em formaldeído 3,7% por 10 minutos e depois, foram permeabilizadas em 0,1% de TritonX-100 por 5 minutos. As lamínulas foram então lavadas três vezes em PBS e depois incubadas com o respectivo anticorpo primário (diluído em PBS, conforme melhor resultado de titulação previamente realizada) por 1 a 2 h em câmara úmida. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas três vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo por 30 minutos em câmara úmida. As lamínulas foram lavadas uma vez em PBS, incubadas com 300 nM de DAPI (1:10.000) para a marcação dos núcleos e 1 μ M de BODYPI (1:600) para a marcação das GLs, por 10 minutos. As lamínulas foram lavadas três vezes em PBS e montadas em lâminas para visualização por microscopia óptica de fluorescência utilizando o microscópio OLYMPUS BXS1 e por microscopia de fluorescência confocal utilizando o microscópio LEICA TCS-SPE disponível no CENABIO.

4.9 Extração de lipídeos e cromatografia em camada delgada (TLC)

O protocolo utilizado foi adaptado do protocolo de extração de *Bligh and Dyer* (Bourque *et al.*, 2009). As células foram distribuídas em placas de 60 mm e ao atingirem a confluência necessária, foram ressuspensas. A fim de garantir a mesma quantidade de células para cada amostra, foi realizada a contagem das células e o volume ajustado para que cada amostra tenha 3×10^6 de células. Estas, foram ressuspensas em 0,35 ml de água destilada autoclavada e transferidas para tubos de ensaio de vidro pequenos com tampa. Para extração dos lipídeos da amostra, foram adicionados 0,5 ml de clorofórmio, 1 ml de metanol, sendo as amostras passadas em vortex quatro vezes por um minuto, com intervalo de 1 minuto no gelo. Em seguida, foram adicionados 0,5 ml de clorofórmio, sendo misturado vagarosamente. O sobrenadante foi deixado por 5 minutos descansando com mistura ocasional. Após esse

tempo, foram adicionados 0,5 ml de água destilada a qual foi misturada vagarosamente à amostra. Depois de uma incubação de 5 minutos (com mistura ocasional), foi feita uma centrifugação de 5 minutos a 3000 rpm, tendo então formado duas fases separadas por um “biscoito” (precipitado de proteínas), em que é descartado o líquido de cima (fase aquosa) e coletada a fase abaixo da faixa de proteínas (fase orgânica), sendo transferida para outro tubo. Por fim, as amostras foram secadas em banho seco a 80°C ou em nitrogênio gasoso (N₂), sendo armazenadas na temperatura de -20°C para posterior corrida de TLC (*thin-layer chromatography*).

Para a realização da TLC, cada amostra foi ressuspendida em 125 µl de clorofórmio. Foi realizada uma marcação a lápis com os pontos em que as amostras foram aplicadas, sendo necessário espaços de 1 cm entre cada ponto. Foram aplicados 20 µl de cada amostra na placa de TLC e 2 µl de cada padrão (triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol, ácido graxo, ésteres de colesterol e colesterol). A corrida de TLC foi realizada em uma cuba de vidro contendo um papel de filtro do tamanho da placa de TLC, que foi embebido nos solventes. O primeiro solvente (solvente A) usado foi a mistura éter de petróleo:dietiléter:ácido acético (70:30:2). A corrida de TLC com o solvente A, ocorreu em somente em 2/3 da placa que, após a corrida, foi retirada da cuba para secar. O segundo solvente utilizado (solvente B) foi o éter de petróleo:dietil éter (100:2). A placa foi recolocada na cuba de vidro para a corrida do solvente B, que correu até o final da placa. Ao final da corrida, foi preciso deixar a placa secando para por fim incubá-la com vapor de iodo (I₂) para revelação. A quantificação densitométrica das bandas foi realizada com o programa ImageJ Fiji 1.51W, com o cuidado de descontar o *background* adjacente.

4.10 Expressão da proteína C do DENV (DENV C) em bactérias

A transformação da bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3)plysS com o plasmídeo pET3a (66 ng/µL) contendo o gene da proteína C foi realizada por choque térmico. Foi adicionado 1µL do plasmídeo em 50µl de *E. coli* e incubado por 30 minutos no gelo. Em seguida, as células foram colocadas por 1 minuto a 42°C sendo depois recolocadas no gelo por 5 minutos. Foram adicionados 450 µl de meio Luria-Bertani (LB) líquido às bactérias, deixando-as em agitação a 37°C, durante 1 hora sob agitação de 220-250 rotações por minuto (rpm) para o crescimento bacteriano. As bactérias foram

concentradas por centrifugação a 4000 rpm por 4 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em 100µL de meio LB líquido e as células já transformadas foram plaqueadas em meio LB Ágar contendo os antibióticos ampicilina (AMP, 100 µg/mL) devido ao gene de resistência presente no plasmídeo e cloranfenicol (CLO, 34 µg/mL), por causa da resistência presente na bactéria utilizada. A placa foi incubada *overnight* a 37°C para seleção dos clones resistentes que contêm o plasmídeo. Após esse período, diversas colônias individualizadas (unidades formadoras de colônia - UFC) foram formadas. Cada colônia formada foi originada a partir de uma única célula transformada contendo a dupla resistência de antibióticos. Uma colônia foi selecionada e transferida para 5mL de meio LB líquido contendo AMP e CLO e incubada a 37°C sob agitação de 200 rpm durante aproximadamente 5 horas até que a densidade ótica (DO₆₀₀) da cultura atingisse 0,9. A cultura foi novamente concentrada por centrifugação a 4000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado pelas bactérias foi ressuspensionado e transferido em 30 mL de meio mínimo (M9) contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol. As bactérias foram deixadas *overnight* a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Os 30mL foram transferidos para 300mL de M9 (diluição 1:10) também contendo ampicilina e cloranfenicol. Após a DO₆₀₀ atingir 0,9, a expressão da proteína C foi induzida com 0,5 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) a 18°C, sob agitação de 200 rpm, *overnight*.

O meio mínimo utilizado para expressão da proteína mutante foi composto de 200 mL de solução Na₂HPO₄ 240 mM, KH₂PO₄ 110 mM, NaCl 43 mM, pH 7,35; 2 mL de solução MgSO₄ 1M; 20 mL de solução de glicose 20%; 100 µL de solução CaCl₂ 1M; 1 mL de solução de tiamina 10 mg/mL; 40 mL de solução NH₄Cl 25 mg/mL; 738 mL de H₂O MilliQ, 1 mL de ampicilina e 1 mL de cloranfenicol (Adaptado de Cai *et al.*, 1998)

4.11 Purificação de DENVC

Após a indução proteica, a suspensão de bactérias induzidas à expressão de DENVC foi submetida à centrifugação a 5000 rpm, durante 30 minutos, a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* recuperado, uma vez que o sistema empregado para a produção da proteína não permite que a bactéria acrete para o sobrenadante. Assim, a proteína de interesse encontra-se no interior da bactéria

até que uma etapa de lise seja realizada. O *pellet* foi ressuscitado em tampão de lise (Hepes 25 mM / NaCl 0,2 M/ EDTA 1 mM / glicerol 5% pH 7,4). Para impedir a degradação das proteínas, foi adicionado ao tampão de lise um coquetel inibidor de proteases para células bacterianas (P8465 - Sigma), cuja composição é AEBSF 1,15 mM, Bestatina 0,1 mM, EDTA 5 mM, E-64 15 μ M e Pepstatina A 15 μ M. A lise bacteriana foi realizada em um processador ultrassônico de 130 *watts*, com uma potência de 60% durante 25 ciclos de 30" cada. Para a precipitação, a concentração final de sal do lisado celular foi ajustada para 2,0 M com a adição de NaCl sob agitação a 4°C. O conteúdo foi ultracentrifugado a 30.000 rpm durante 1h a 4°C em rotor 45Ti. Ao final da centrifugação, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante, contendo a proteína de interesse, foi filtrado em membrana de 22 μ m. A amostra filtrada foi diluída 4x para ser eluída na coluna Heparin HiTrap com concentração inicial de 0,5 M de NaCl. A eluição foi feita junto a um gradiente linear de NaCl (0,5M, 1,0M, 1,5M e 2,0 M). A proteína C purificada foi eluída em NaCl 1,5M e coletada em frações de 3 ml. A confirmação da purificação foi feita por eletroforese em gel 18% de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4.12 Produção de anticorpo contra proteína C do DENV

Um Coelho albino (Nova Zelândia) foi imunizado com proteína C purificada na dose de 400 μ g em adjuvante de Freund incompleto, por injeção subcutânea. Ao total foram realizadas 5 injeções com intervalos de 15-20 dias cada. A produção de Ab anti-DENVC foi confirmada a partir de *western blot*. O sangue foi coletado e processado para separar o soro, que foi diluído em tampão PBS na concentração final de 1X, 0,05% de azida sódica e 30% de glicerol. Uma parte foi aliqotada em eppendorfs e armazenado a -20°C e outra parte, armazenado a -80°C para melhor conservação (**Figura 9**).

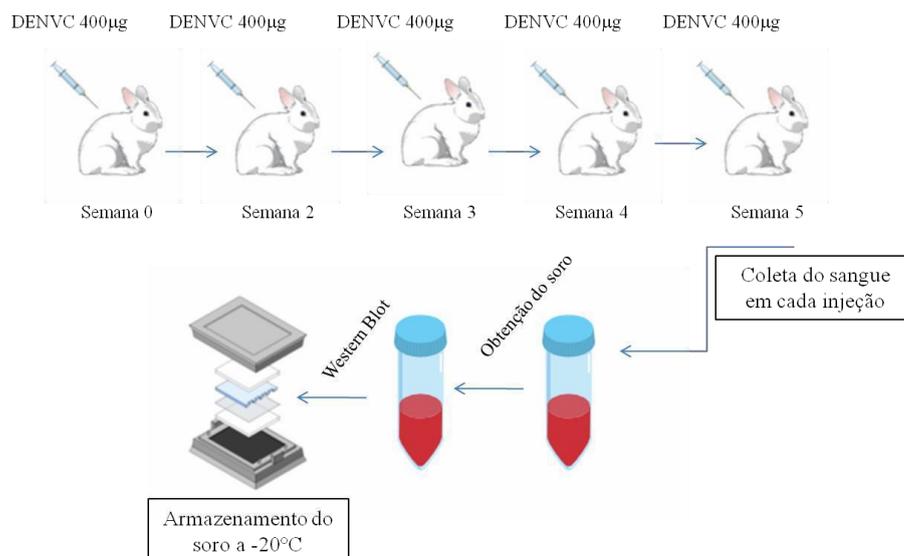


Figura 9 – Esquema representativo da produção do anticorpo anti-DENVC em coelhos albinos. Foram realizadas 5 injeções subcutâneas de DENVC purificada com adjuvante de Freund incompleto, em intervalos de 15-20 dias. Após a produção ter sido confirmada por *western blotting*, o sangue do coelho foi coletado e processado para o armazenamento do anticorpo.

4.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos gráficos de barras e de dispersão foram realizadas por anova de uma via e Turkey como pós teste, utilizando o programa Prism5 (versão 5.01). Os asteriscos representam significância estatística entre as condições indicadas, sendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

5 RESULTADOS

5.1. Avaliação da eficiência do sistema CRISPR/Cas 9.

A fim de confirmar o silenciamento do gene da Tip47 na sublinhagem policlonal e nos clones gerados a partir dela, foi realizado *western blotting* para Tip47 e α -tubulina, sendo o último usado como controle de carregamento. O mesmo foi feito com a sub-linhagem controle Δ Scrb, a qual passou por todo o processo de transdução/seleção para expressão de Cas9, mas que expressa um gRNA de sequência aleatória. Após a

revelação do *western blotting*, foi possível confirmar a presença de Tip47 na linhagem Δ Scrb, bem como uma redução de 82% da expressão desse gene na linhagem policlonal (Huh7- Δ Tip47-pol), sendo que diferentes clones apresentaram diferentes níveis de expressão do gene (**Figura 10A e 10B**). Com a realização da quantificação densitométrica das bandas de Tip47, foi possível observar diferenças entre os clones quanto à expressão de Tip47 (**Tabela 1**). Para os ensaios subsequentes foi escolhido o clone E7, que apresentou expressão baixa ou mesmo nula de Tip47.

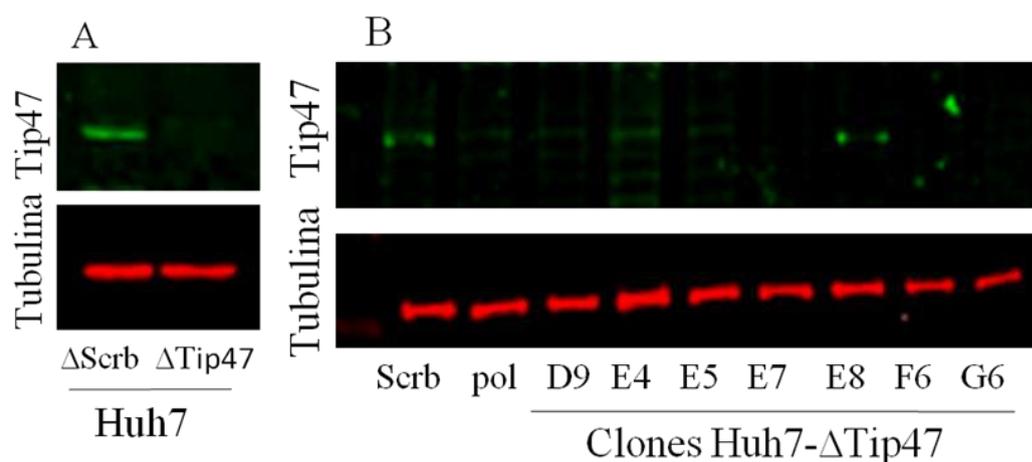


Figura 10 – Expressão de Tip47 nas sublinhagens Huh7- Δ Scrb e Huh7- Δ Tip47 (policlonal e clones). (A) *western blot* para Tip47 e tubulina em que foi avaliada a presença de Tip47 na linhagem Δ Scrb e a redução da expressão dessa proteína na sublinhagem Δ Tip47 policlonal. (B) *western blot* para Tip47, confirmando a significativa redução da expressão de Tip47 nas sublinhagens clonais.

Tabela 1 – Quantificação densitométrica das bandas de *western blot* demonstradas na figura 1B e as relações entre elas, incluindo a expressão relativa de Tip47 entre as células controle (Δ Scrb) e as diferentes sublinhagens policlonal (pol) e clones.

	Tip47	GAPDH	Tip/GAPDH	Relativo ao Δ Scrb
Huh7 Δ Scrb (300317)	1,45	127,64	0,011	1
Δ Tip47 pol (300317)	0,29	144,17	0,002	0,18
Δ Tip47 D9 (090517)	0,51	100,59	0,005	0,45
Δ Tip47 E4 (110517)	0,64	187,46	0,003	0,30
Δ Tip47 E5 (110517)	0,49	110,64	0,004	0,39
Δ Tip47 E7 (110517)	0,12	95,47	0,001	0,11
Δ Tip47 E8 (110517)	1,38	93,42	0,015	1,30
Δ Tip47 F6 (110517)	0,13	68,71	0,002	0,17
Δ Tip47 G6 (110517)	0,2	51,29	0,004	0,34

5.2 Perfil lipídico das células crispadas

Com o objetivo de verificar se a depleção de Tip47 é capaz de alterar a morfologia das GL das células Huh7, realizamos a marcação dessas organelas nas sublinhagens controle (Huh7 parental e Huh7- Δ Scrb) e nas sublinhagens deletadas para o gene (Huh7- Δ Tip47-pol e Huh7- Δ Tip47-E7). Para isso, foi realizado ensaio de fluorescência por microscopia confocal de GL marcadas por BODYPI (**Figura 11**). Observando o aspecto geral das GL dessas células, pudemos observar uma redução perceptível no tamanho das gotículas lipídicas presentes na sublinhagem clonal (Huh7- Δ Tip47-E7) em comparação com as células controle (Huh7 parental e Huh7- Δ Scrb), mas não pudemos observar o mesmo na sublinhagem policlonal. Vale ressaltar que não foi possível quantificar o número e tamanho das GL, pois os hepatócitos tipicamente apresentam um conteúdo muito grande de GL que, quando sobrepostos com as diferentes camadas de *Z-stack*, acabam por se fundir, inviabilizando a quantificação. Dessa forma, optamos por aqui mostrar apenas uma análise visual grosseira em um resultado representativo que tivemos (figura 11). Para contornar isso, futuramente faremos o mesmo ensaio em outro tipo celular que contém menos GL a fim de tornar possível a quantificação das imagens.

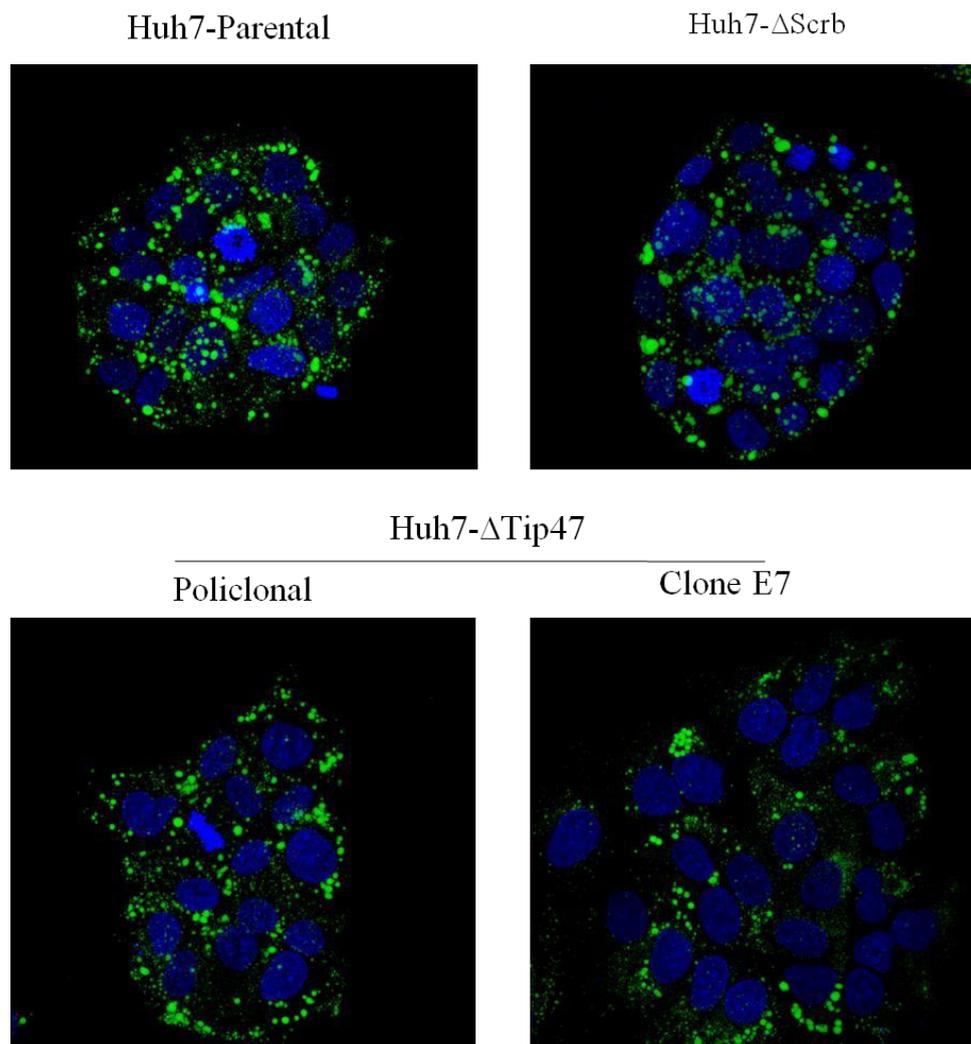


Figura 11 – Representação do aspecto morfológico das GL de células Huh7 parental e das sublinhagens Δ Scrb, Δ Tip47-pol e Δ Tip47-E7. O núcleo das células foi corado com DAPI (azul) e as GL, coradas com BODIPY (verde) para realização da microscopia confocal.

Para investigarmos possíveis alterações no conteúdo lipídico total entre as células Huh7 controle e as sublinhagens Δ Tip47, realizamos cromatografia de camada fina (TLC) de extratos lipídicos dessas células, conforme descrito nos métodos. Nestes ensaios analisamos as seguintes classes de lipídios: TAG (triacilglicerol), DAG (diacilglicerol) + colesterol livre (que correm juntos na TLC) e ésteres de colesterol (CE). Embora tenhamos realizado esse experimento apenas duas vezes, os resultados sugerem que não há diferença considerável quanto ao conteúdo desses lipídios nas células testadas (**Figura 12**).

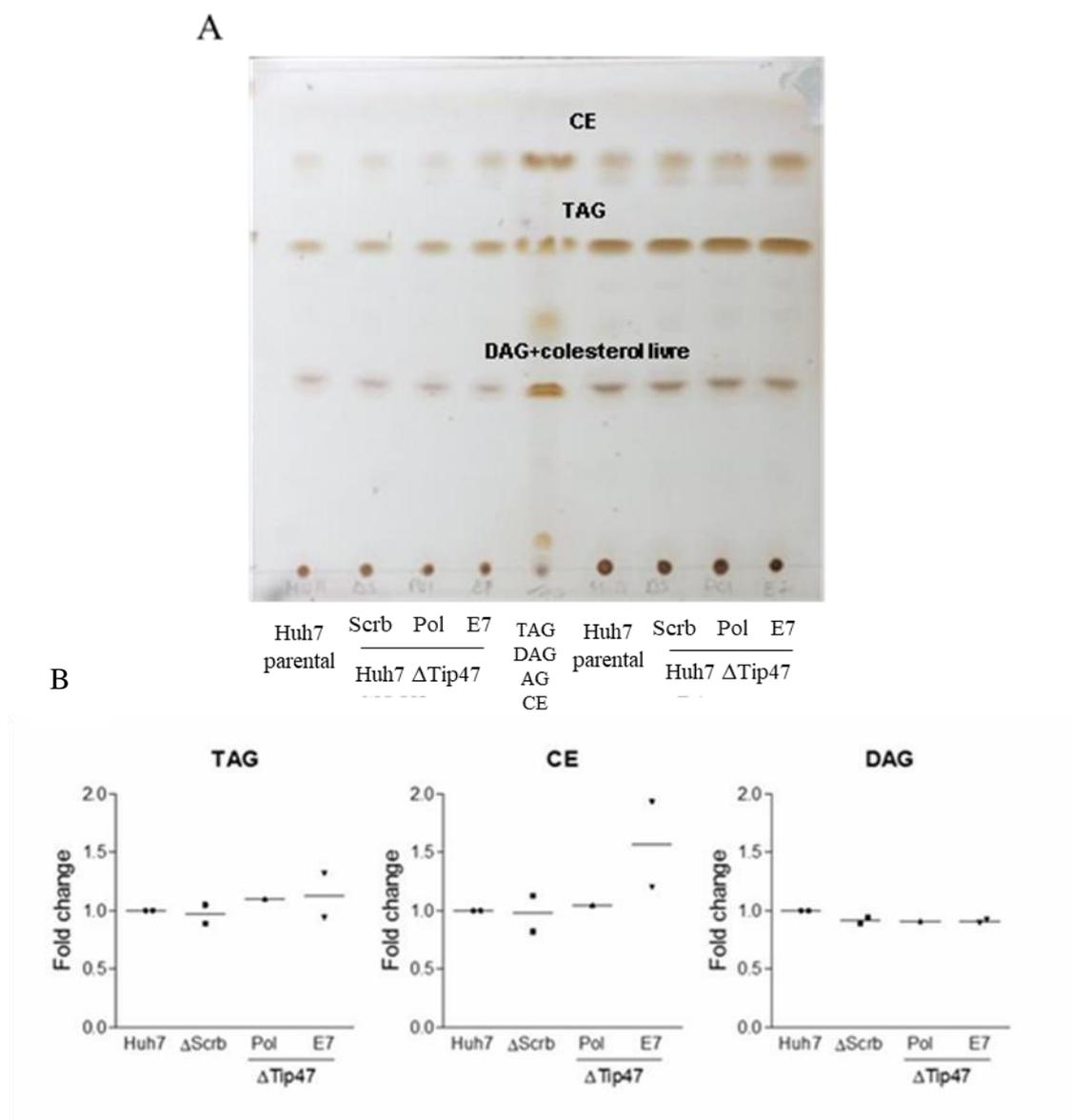


Figura 12: Conteúdo lipídico das células Huh7 parental, Huh7-ΔScrb, Huh7-ΔTip47-pol e Huh7-ΔTip47-E7. Cromatografia de camada fina para avaliação da composição lipídica dessas células, em que a extração de lipídios foi realizada de acordo com uma adaptação do protocolo de *Bligh and Dyer* (Bourque *et al.*, 2009). **(A)** Imagem representativa de placa de sílica após a corrida do TLC. **(B)** Gráficos gerados a partir da quantificação densitométrica das bandas (dados obtidos por Gabriel Soares e Julianna Zeidler). TAG= triacilglicerol, CE=ésteres de colesterol, DAG= diacilglicerol+colesterol livre.

5.3 Efeitos da infecção pelo DENV nas sublinhagens Huh7 controle e deletadas para Tip47

5.3.1 Efeitos da infecção pelo DENV na expressão de Tip47

Com o objetivo de identificar se a infecção pelo DENV altera a expressão de Tip47 nas células Huh7, realizamos *western blotting* e PCR quantitativo para o gene nas condições mock e infectada. Nenhuma alteração da expressão de mRNA (**Figura 13**) e proteica (**Figura 14**) desse gene foi observada nas condições testadas.

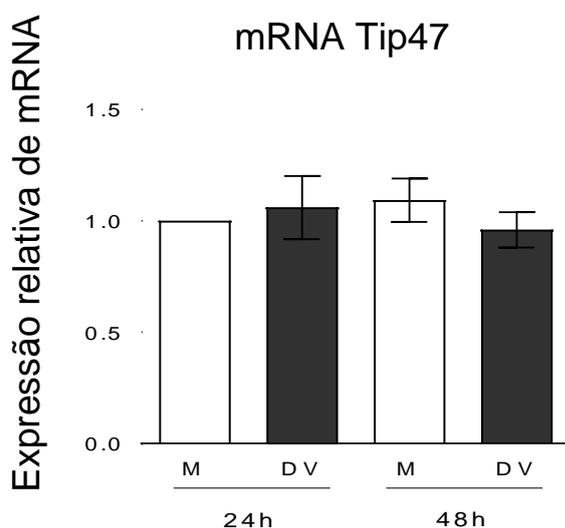


Figura 13 – Expressão relativa de mRNA de Tip47 nas células Huh7. PCR quantitativo de Tip47 em células Huh7 na condição mock e infectadas pelo DENV (24h e 48h pós infecção).

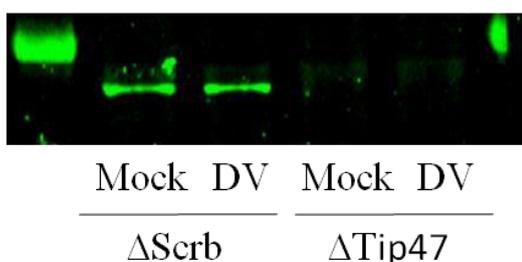


Figura 14 – Expressão proteica de Tip47 nas sublinhagens Huh7 Δ Scrb e Δ Tip47-policlonal nas condições mock e infectada com DENV. *Western Blot* para Tip47 nas células Huh7- Δ Scrb e Huh7- Δ Tip47-pol, nas condições mock e infectada por DENV (24 h pós infecção).

5.3.2 Efeitos da deleção de Tip47 na replicação do DENV em células Huh7

Avaliamos também se a ausência de expressão de Tip47 afeta a porcentagem de infecção pelo DENV em hepatócitos Huh7. Para isso, foi realizada imunofluorescência para proteína E do DENV nas células Huh7- Δ Scrb, Huh7- Δ Tip47-pol e Huh7- Δ Tip47-E7 a fim de avaliar o percentual de infecção nessas células 24h após a infecção (M.O.I.=1) (**Figura 15A, 15B, 15C**). Dentre as linhagens estabelecidas que sofreram deleção para Tip47, podemos observar que a porcentagem de infecção do DENV2 é reduzida apenas nas células Huh7- Δ Tip47-E7 (**Figura 15D**). Isso sugere que a ausência de Tip47 pode interferir na expressão de proteínas virais ou mesmo na capacidade das células Huh7 serem infectadas com DENV.

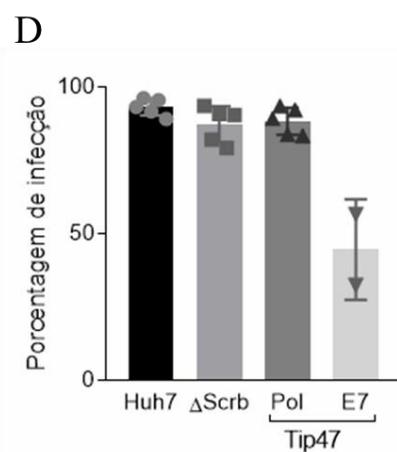
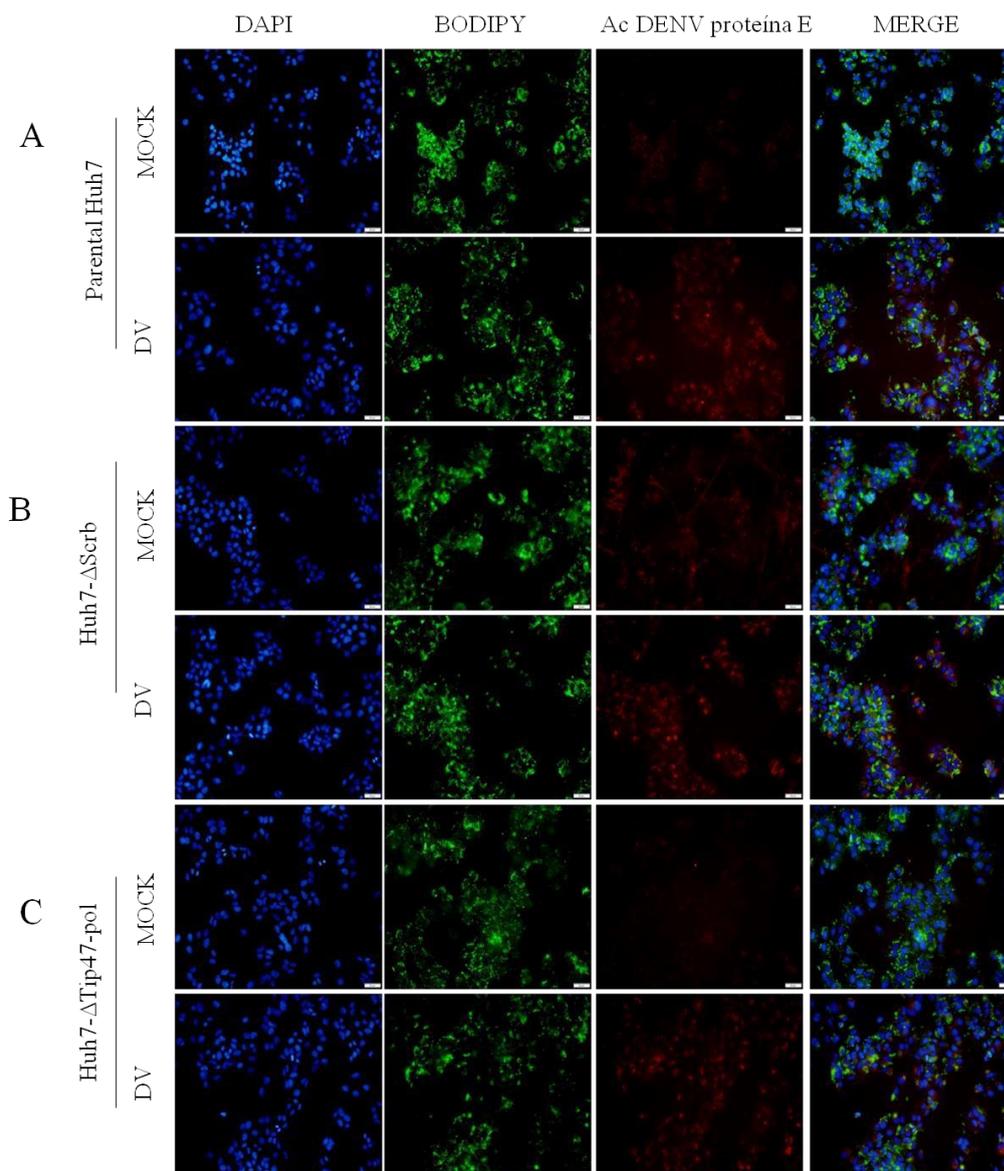


Figura 15 – Percentual de infecção do DENV em células controles (Huh7 parental e Huh7-ΔScrb) e Huh7-ΔTip47 (policlonal e clone E7). O núcleo das células foi corado com DAPI (em azul), as gotículas lipídicas coradas com BODIPY (em verde), e as células infectadas foram marcadas com

anticorpo anti-proteína E do DENV2 (em vermelho) por imunofluorescência. São mostradas as células Huh7 parental (A), Huh7- Δ Scrb (B) e Huh7- Δ Tip47 policlonal (C) nas condições mock e infectadas (MOI=1). (D) Gráfico representando o percentual de infecção nessas células.

Para determinar o número de partículas virais viáveis produzidas durante a infecção pelo DENV nas células Huh7 deletadas para Tip47 comparadas às controle, foram realizados ensaios de titulação viral. As células Huh7 parental, Huh7- Δ Scrb, Huh7- Δ Tip47-pol e Huh7- Δ Tip47-E7 foram infectadas com DENV (M.O.I.=1), sendo o sobrenadante delas coletado 24h após a infecção e titulados por ensaios de placa de lise (n=3). Com a quantificação das partículas virais produzidas, foi observado que apenas a sublinhagem Huh7- Δ Tip47-E7 apresentou menor capacidade de produção de vírus (cerca de 48 vezes menos do que nas células controle) quando comparado com as células controle (**Figura 15**).

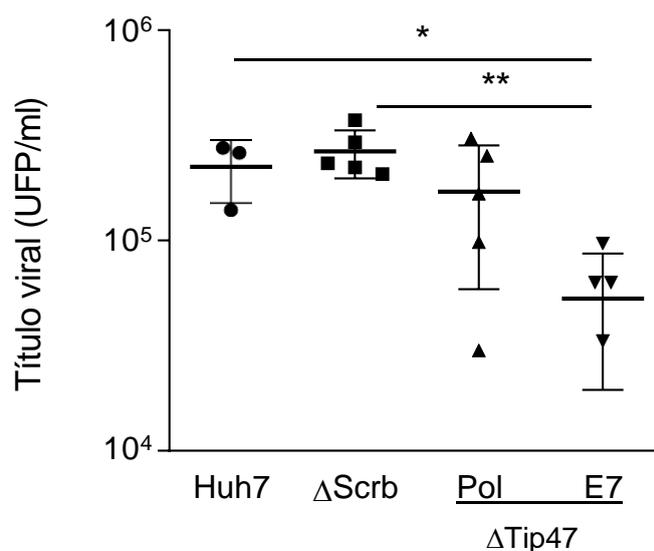


Figura 16– Produção de partículas virais do DENV2 nas células Huh7 parental, Huh7- Δ Scrb, Huh7 Δ Tip47-pol, Huh7 Δ Tip47-E7. Número de partículas virais liberadas no tempo de 24h de infecção, obtido por meio de titulação dos sobrenadantes por ensaio de placa de lise (expresso em UFP/mL).

Através da cromatografia de camada fina (TLC), quisemos avaliar também se a infecção pelo DENV alteraria o conteúdo lipídico dessas células. Para isso, os lipídios foram extraídos 24h pós infecção, M.O.I.=1. O resultado que obtivemos é que não há diferença no conteúdo de éster de colesterol e DAG + colesterol livre nas células Huh7 Δ Tip47 submetidas às condição mock e infectadas com DENV (**Figura 17 A**). Já o conteúdo de TAG das células Huh7- Δ Scrb mock, Huh7- Δ Tip47-E7 mock e infectadas

com DENV se mostraram superiores, com significância estatística, quando comparado com o conteúdo de TAG das células Huh7 parentais na condição mock, que foi usado como referência para fazer o comparativo entre os diferentes ensaios. No entanto, não podemos ainda afirmar que tais diferenças existem, pois não foi incluída nessas quantificações a variação interna da condição usada como referência (Huh7 parental mock). Para contornar isso, faremos uma TLC com todas as amostras Huh7 parental mock com o objetivo de quantificarmos as variações de conteúdo lipídicos entre as amostras de diferentes ensaios. Feito isso, o resultado será incorporado no gráfico e a estatística refeita.

Ao analisar a relação entre os lipídeos na condição infectada com DENV em relação à mock, podemos afirmar que a infecção por si não alterou o conteúdo de TAG, CE e DAG + colesterol livre em nenhuma das células testadas (**Figura 17 B**).

para cada célula. Os asteriscos indicam comparações significativas em relação a Huh7 mock. Dados cedidos por Gabriel Soares e Julianna Zeidler.

5.4 A deleção de Tip47 não reduz a replicação do vírus mayaro (MAYV) em células Huh7

Ao manipularmos as células Huh7 Δ Tip47-E7, observamos que as mesmas proliferam a taxas mais baixas quando comparadas às demais células (dado não mostrado). Para verificar se essas células, as quais apresentam expressão nula de Tip47, produzem menos partículas de DENV devido a sua menor taxa de proliferação (um efeito que presumimos estar relacionado à ausência de expressão de Tip47, pois foi observado também em outros clones), infectamos as células Huh7 parental, Huh7- Δ Scrb, Huh7 Δ Tip47-pol e Huh7 Δ Tip47-E7 com o vírus Mayaro, um alphavírus da família Togaviridae não relacionado ao DENV. Avaliamos o percentual de infecção do vírus 24h após a infecção dessas células (M.O.I.=1) e não observamos nenhuma alteração quanto à produção de partículas de MAYV (**Figura 16**). Além disso, o título viral dessas células também não foi alterado. Isso sugere que a redução do número de partículas do DENV observada anteriormente não está relacionada a possíveis retardos na progressão do ciclo celular gerados pela ausência de Tip47 nas células Huh7, mas provavelmente se dá por outros mecanismos desencadeados pela ausência de expressão dessa perilipina.

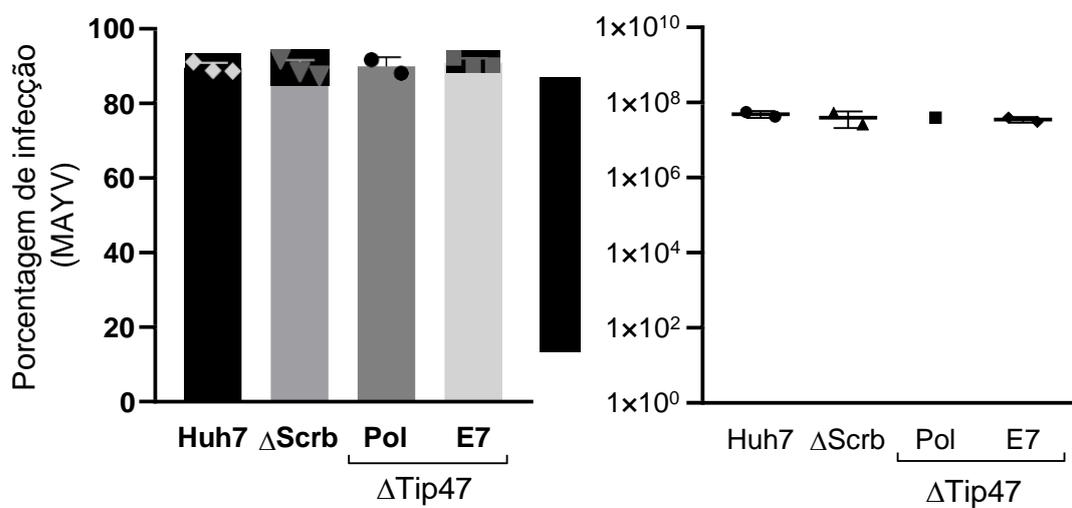
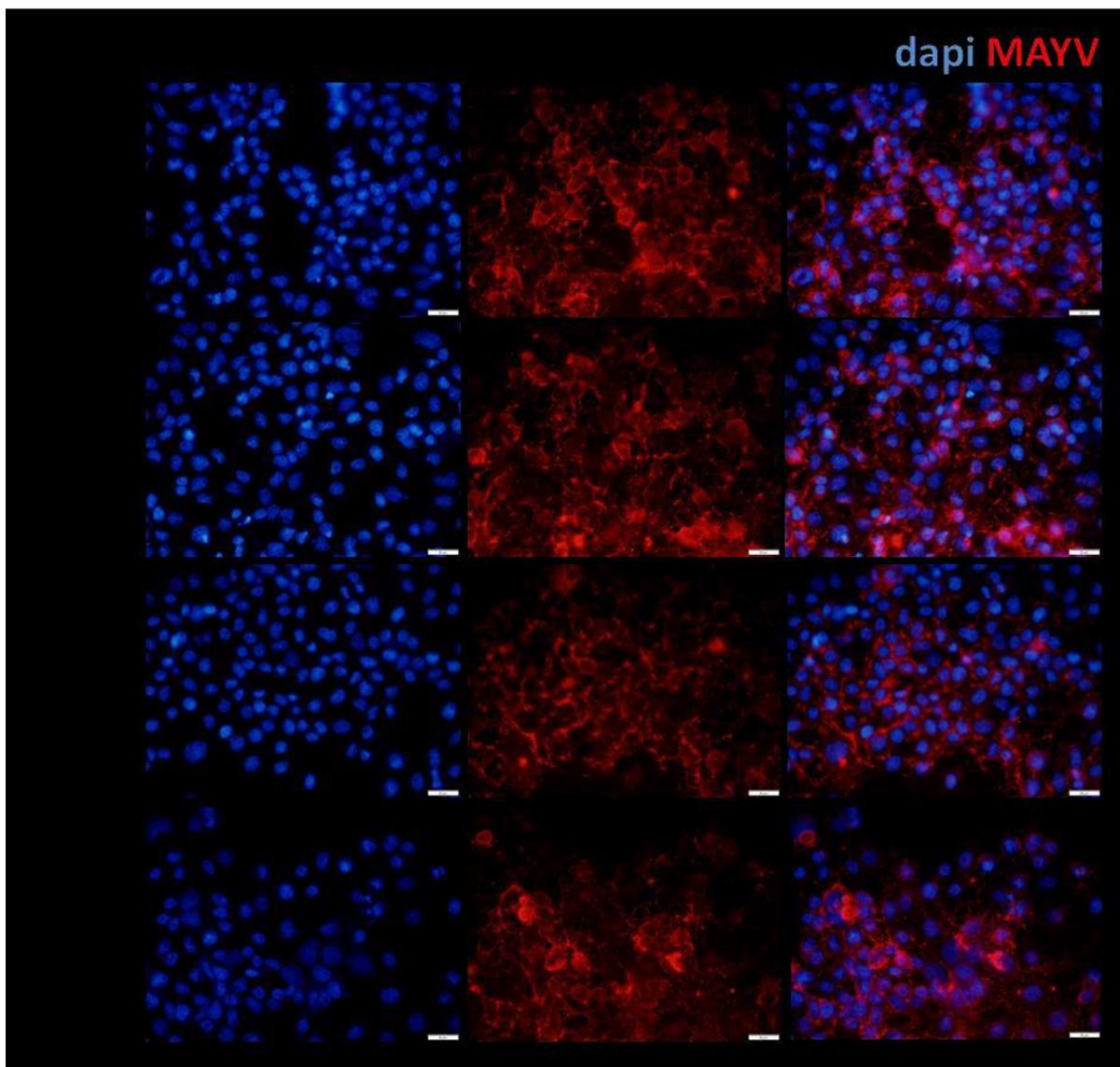
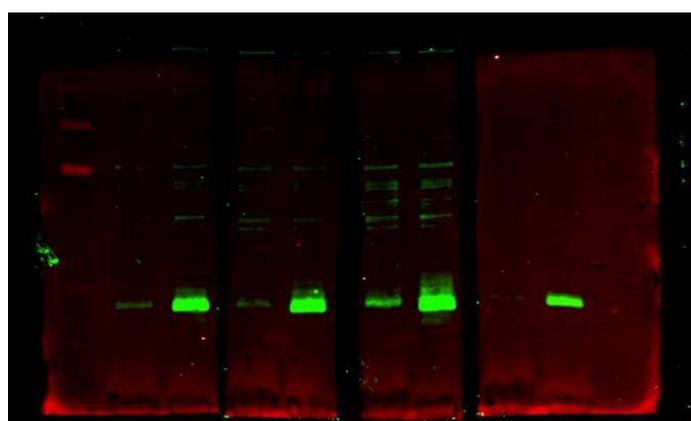


Figura 18– Infecção de células Huh7 parental, Δ Scrb e Δ Tip47 (policlonal e clone E7) pelo MAYV. A) Imagem representativa de imunofluorescência de células Huh7 infectadas com MAYV. O núcleo das células foi corado com DAPI (em azul) e, em vermelho, marcação para um sítio conservado da proteína E1 de alfavírus. B) Gráfico representando o percentual de infecção das células. C) Título viral obtido pela infecção por MAYV nessas células (dados cedidos por Lorena Siqueira).

5.5 Localização da DENVC em células Δ Tip47

Em diferentes tipos celulares foi demonstrado que durante a infecção pelo DENV a proteína capsídica é direcionada para a superfície de GL e se acumulam nessas organelas. Existe a possibilidade desse evento ser dependente da interação entre DENVC e Tip47. Com base nisso, pretendemos avaliar se esse padrão de localização se mantém nas sublinhagens de Huh7 deletadas para Tip47. Produzimos então o anticorpo contra DENVC em um coelho albino com o objetivo de ser usado posteriormente em ensaios de imunofluorescência para determinação da localização subcelular de DENVC nas células Huh7 Δ Tip47. Ao final da imunização, obtivemos um anticorpo que pode ser usado na diluição 1:5000 em ensaios de *western blotting* (**Figura 16**). As condições necessárias para realização de ensaios de imunofluorescência precisam ainda serem padronizadas.



MOCK DV MOCK DV MOCK DV MOCK DV
1:5000 ON 1:1000 - 1h 1:2000 - 1h 1:5000- 1h

Figura 19: Avaliação da produção do anticorpo anti-proteína C do DENV. Por *western blot*, testamos a produção do anticorpo em diferentes tempos e diluições em amostras de proteína de células mock e infectadas com DENV: 1:5000 *overnight* (ON), 1:1000 por 1h, 1:2000 por 1h e 1:5000 por 1h hora.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, cada vez mais estudos vem tentando descrever como se dá a relação da infecção pelo DENV e o metabolismo lipídico (Fernandes-Siqueira *et al.*, 2018; Cingolani e Czaja, 2016; Iglesias *et al.*, 2015; Heaton e Randall, 2010; Samsa *et al.*, 2009). Seguindo nessa linha, silenciámos a perilipina Tip47 nas linhagens de hepatócitos humanos Huh7 a fim de avaliar a dependência dessa proteína na infecção pelo DENV e sua relação com o metabolismo lipídico das células infectadas. Tivemos como base estudos anteriores em que foi mostrado que DENV interage com perilipinas *in vitro*, sendo mais fortemente com Tip47 (Carvalho *et al.*, 2011). Nossa hipótese é que as GL servem de plataforma para a montagem de partículas virais e que Tip47 seria determinante para que proteínas estruturais virais se localizem na superfície dessas organelas. No entanto, existe também a possibilidade das perilipinas serem importantes para outros aspectos da biologia do vírus, tais como controlar o acesso de ácidos graxos das GL, modular a morfologia das GL e/ou alterar o conteúdo lipídico dessa organela de maneira que favoreça de alguma forma a replicação do DENV nas células-alvo. Alguns desses aspectos foram aqui explorados, como discutido adiante.

Resultados preliminares obtidos anteriormente em nosso grupo, haviam indicando um aumento na expressão de mRNA e proteica de Tip47 em linhagens de hepatócitos humanos infectados com DENV (dados não publicados), sendo isso um forte indicativo de que Tip47 teria um papel importante durante a infecção. No entanto, na época foi identificada contaminação por micoplasma nas células usadas para esses ensaios. Dada a pouca confiabilidade desses dados, resolvemos repetir os experimentos. Apesar do que foi visto anteriormente, a expressão gênica e proteica de Tip47 não foi alterada nos ensaios que realizamos recentemente, mas isso não descarta a possibilidade de que Tip47 tenha um papel importante na replicação do DENV. Sendo assim, mesmo não tendo reproduzido tal resultado, decidimos por continuar com nossas investigações.

Os resultados obtidos por imunofluorescência, onde o percentual de infecção do DENV foi quantificado, nos mostra que o vírus é capaz de se replicar e expressar suas proteínas nas células Huh7- Δ Scrb, Huh7- Δ Tip47 policlonal, e Huh7- Δ Tip47 clone E7. Entretanto, observamos uma redução considerável no percentual de infecção das células Huh7- Δ Tip47 clone E7 em comparação ao obtido nas células controle ou mesmo nas Huh7- Δ Tip47 policlonais. Já na titulação viral, onde avaliamos a quantidade

de partículas virais viáveis produzidas, vimos que as células Huh7- Δ Tip47-E7 foram capazes de produzir cerca de 50 vezes menos partículas virais do que as células controle, novamente sugerindo que a expressão de Tip47 é necessária para ótima produção de DENV em hepatócitos Huh7. O fato de as células Huh7- Δ Tip47 policlonais, que ainda apresentam algum nível de expressão de Tip47 devido à sua variabilidade genética (conforme explicado nos métodos), se comportarem semelhantemente às células controle, sugere que existe nível crítico para a ausência de Tip47 influenciar na replicação e/ou montagem de partículas virais. Para confirmar isso, pretendemos testar outros clones que são também completamente silenciados para Tip47.

Os resultados que obtivemos aqui ratificam a nossa hipótese de que a Tip47 seja necessária para a ótima produção de partículas virais, mas a depleção dessa proteína não inibiu completamente a produção de DENV em hepatócitos Huh7. Disso concluímos que Tip47 é importante, mas não essencial para a produção de DENV em nosso modelo. Isso pode ser explicado por um mecanismo compensatório, sendo que na ausência de Tip47 outra perilipina pode acabar por substituí-la e amenizar os efeitos na infecção. A compensação entre perilipinas já foi descrito previamente em diferentes contextos, sendo que animais *knockout* para PLIN específicas geralmente apresentam apenas efeitos brandos na homeostase lipídica do organismo (Kimmel e Sztalryd *et al.*, 2016). PCR quantitativo para as cinco isoformas de perilipinas mostraram que células Huh7 expressam níveis consideráveis Tip47, mas principalmente de PLIN2, o que é esperado para células hepáticas, sendo que não foi detectado expressão de mRNA de outras perilipinas nessa linhagem celular (dados preliminares obtidos por Julianna Zeidler, não incluídos neste documento). Pode ser então que PLIN2, que é mais abundante do que Tip47 nessas células, compense parcialmente os efeitos da deleção de Tip47 em Huh7. Dito isso, o resultado que obtivemos é surpreendente e indica que de fato existe uma dependência de Tip47 na replicação do DENV nessas células, pois a expressão de PLIN2 não compensou por completo a ausência de expressão de Tip47. Pouco se sabe sobre o papel diferencial atribuído a Tip47 e PLIN2 em células hepáticas. Foi proposto que Tip47 representa um componente secundário nesse tecido comparado a PLIN2, mas que ambas atuam inibindo a lipólise de GL (Kimmel & Sztalryd *et al.*, 2016). Porém, além de exercer essa função, foi também proposto que PLIN2 atua na produção de VLDLs hepáticas. Pretendemos futuramente investigar os efeitos da deleção de PLIN2 e

da dupla deleção de PLIN2 e PLIN3 na produção de DENV, sendo que já clonamos gRNA para PLIN2 em vetor pLentiCRISPR. Falta ainda, estabelecermos sublinhagens estáveis deletadas para essas proteínas para prosseguirmos com essas investigações.

Já foi descrito na literatura que a infecção do DENV gera o aumento de GLs em diferentes modelos celulares (Samsa *et al.*, 2009; Assunção-Miranda *et al.*, 2010). Por outro lado, foi também reportado que em células hepáticas infectadas pelo DENV ocorre uma diminuição do conteúdo de gotículas lipídicas, sendo isso correlacionado com o aumento da β -oxidação nessas células (Heaton e Randall, 2010). Os resultados que obtivemos através de TLC, que nos fornece informações quanto ao conteúdo lipídico das células, revelam que não há diferença no conteúdo intracelular de TAG (triacilglicerol), DAG (monoacilglicerol) + colesterol livre ou CE (ésteres de colesterol) entre as células infectadas e as células tratadas com mock, tanto nas células controle quanto nas depletadas para Tip47. Isso pode ser explicado pelo aumento simultâneo tanto da síntese quanto da oxidação de ácidos graxos durante a infecção, o que já foi sugerido anteriormente (Fernandes-Siqueira *et al.*, 2018). O balanço e a dinâmica entre as vias antagônicas podem acabar por não resultar no acúmulo de lipídeos, que é o que propomos para explicar nossos resultados. Enquanto que a biossíntese de lipídios parece ocorrer nos sítios de replicação viral, possivelmente fornecendo lipídeos para a formação das membranas convolutas (que são verdadeiras organelas membranosas formadas durante a infecção, que constituem os sítios de replicação dos vírus) a partir do retículo endoplasmático, os ácidos graxos parecem ser mobilizados de GL para serem oxidados nas mitocôndrias, fornecendo assim o aporte energético necessário para a replicação viral (Zeidler *et al.*, 2017). Propomos haver um alto *turnover* de lipídeos durante a infecção, sendo que a ausência de Tip47 parece não interferir nisso. Dessa forma, sugerimos que os efeitos da depleção de Tip47 na infecção pelo DENV em nosso modelo, não está relacionado à função dessa perilipina em modular os níveis de lipídeos das GL, provavelmente se dando via outros mecanismos.

Diversos autores já descreveram que, assim como acontece com o DENV, o HCV também se localiza nas GL durante a infecção e as utiliza como plataforma de montagem de novos vírus (Martins *et al.*, 2018; Iglesias *et al.*, 2015; Saka e Valdivia, 2012). Quando essa localização é rompida, os níveis de progênes virais são significativamente reduzidos. Para o HCV, já é descrito que a Tip47 é necessária para a replicação eficiente do RNA viral (Vogt *et al.*, 2013), visto que ela se associa a NS5A

do vírus e direciona o novo RNA viral sintetizado para as GL. Além do que sugerimos acerca da dependência de Tip47 na produção de DENV, essa perilipina também pode estar associada a uma eficiente replicação do RNA viral, já que vimos uma redução no percentual de infecção na célula Huh7- Δ Tip47 clone E7. A menor produção de partículas virais nessas células (dados da titulação viral) pode ser tanto em decorrência da menor replicação do RNA viral, quanto por uma deficiência da montagem de partículas virais, hipótese considerada pelo fato de que Tip47 presente na superfície de GL já foi vista interagir com DENVC *in vitro* (Carvalho *et al.*, 2011). Os resultados que obtivemos no momento, no entanto, não permitem discriminar entre esses possíveis mecanismos. Posteriormente pretendemos confirmar *in cell* se de fato ocorre a interação dentre Tip47 e DENVC, sendo que por isso produzimos o anticorpo contra proteína C do DENV em nosso laboratório. Além disso, PCR quantitativo de RNA viral nos permitirá responder se a ausência de Tip47 reflete em uma menor replicação do genoma do DENV em células Huh7. O fato do clone Huh7- Δ Tip47-E7 apresentar uma menor taxa de proliferação em relação às demais células não parece explicar sua menor capacidade de produzir partículas de DENV uma vez que, quando infectadas com MAYV, Huh7- Δ Tip47-E7 foram capazes de replicar o vírus muito eficientemente, da mesma forma que as células controle.

Para determinarmos os efeitos da deleção de Tip47 na morfologia e número de GL e se isso interfere na eficiência da infecção pelo DENV, repetiremos os ensaios na linhagem de fibroblastos de pulmão A549, que são também células competentes para a infecção pelo DENV. Isto porque as células Huh7 possuem uma quantidade muito grande de GL, o que nos impossibilitou a quantificação do número e tamanho dessas organelas, sendo essa uma das maiores limitações do modelo que adotamos. Nas A549, pretendemos estender os estudos com a deleção de PLIN2 e com a dupla deleção Tip47 e PLIN2, pois o anticorpo anti-perilipina 2 também foi capaz de inibir a interação das GL com a DENVC em ensaios de microscopia de força atômica (Carvalho *et al.*, 2011). Ensaios de PCR quantitativo para perilipinas mostrou que as células A549, da mesma forma que Huh7, expressam apenas PLIN2 e Tip47 (dado preliminar, não mostrado).

7 CONCLUSÕES

Com os resultados aqui obtidos podemos concluir que Tip47 é importante para a ótima produção de partículas de DENV em hepatócitos humanos da linhagem Huh7. Não detectamos alterações no conteúdo lipídico das células Huh7 depletadas para Tip47 nem mesmo quando infectadas com DENV. Dessa forma, concluímos que DENV não é dependente da função de Tip47 em modular o conteúdo de lipídeos das GL. Além disso, a produção de partículas virais parece também não ser influenciada pela menor taxa de proliferação das células deletadas para Tip47. Mais ensaios se fazem necessários para determinarmos o papel de Tip47 no ciclo de infecção de DENV em hepatócitos humanos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Assunção-Miranda, I., Amaral, F.A., Bozza, F.A., Fagundes, C.T., Sousa, L.P., Sousa, D.G., Pacheco, P., Barbosa-limas, G., Gomes, R.N., Bozza, P.T., Da Poian, A.T., Teixeira, M.M. e Bozza, M.T. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. (2010). *FASEB J*, 24, 218-28.
- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R.W., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J. e Hay, S.I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504–507.
- Brady, O. J., Gething, P.W., Bhatt, S., Messina, J.P., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Moyes, C.L., Farlow, A.W., Scott, T.W. e Hay, S.I. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1760.
- Bourque, S.D. e Titorenko, V.I. (2009). A Quantitative Assessment of The Yeast Lipidome using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Visualized Experiments (JoVe)* 30.
- Brasaelme, D.L. E Wollins, N.E. (2010). Packaging of Fat: An Evolving Model of Lipid Droplet Assembly and Expansion. *The Journal of Biological Chemistry* 4, 2273-2279.
- Cai, M., Huang, Y., Sakaguchi, K., Clore, G.M., Gronenborn, A. M., Craigie, R. (1998). An efficient and cost-effective isotope labeling protocol for proteins expressed in *Escherichia coli*, *Journal of Biomolecular NMR* 11, 97-102.
- Carvalho, F.A., Carneiro, F.A., Martins, I.C., Assunção-Miranda, I., Faustino, A.F., Pereira, R.M., Bozza, P.T., Castanho, M. A. R. B., Mohana-Borges, R., Da Poian A.T. e Santos, N.C. (2011). Dengue Virus Capsid Protein Binding to Hepatic Lipid Droplets (LD) Is Potassium Ion Dependent and Is Mediated by LD Surface Proteins. *Journal of Virology* 86. 2096–2108.
- Cingolani, F. e Czaja, M.J. (2016). Regulation and Functions of Autophagic Lipolysis. *Trends Endocrinology and metabolism* 10, 696-705.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J.M., Conceição, T. M., Higa, L.M., Castanho, M. A. R. B e Da Poian, A.T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews* 39, 155–170.
- Diamond, M.S.E. e Pierson, T.C. (2015). Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell* 162,488-92.
- Fernandes-Siqueira, L.O., Zeidler, J.D., Sousa, B.G., Ferreira, T., e Da Poian, A.T. (2018). Anaplerotic Role of Glucose in the Oxidation of Endogenous Fatty Acids during Dengue Virus Infection. *mSphere* 3, e00458-17.
- Gerold, G., Weigel, J.B.B. e Pietschmann, T. (2017). Protein Interactions during the Flavivirus e Hepacivirus Life Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics* 16, 75–91.
- Gubler. D.J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health* 39, 3-11.
- Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martínez, E., Nathan, M.B., Pelegrino, J.L., Simmons, C., Yoksan, S. e Peeling, R.W. (2015). Dengue: a continuing global threat. *Europe PMC Funders Group* 8, S7–16.
- Heaton, N.S e Randall, G. (2010). Dengue virus induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* 8, 422–432.

- Heaton, N.S., Pererab, R., Bergera, K.L., Khadkac, S., LaCount, J.D., Kuhn, R.J. e Randall, G. (2010) Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *PNAS* 107, 17345–17350.
- Iglesias, N.G., Mondote, J.A., Byk L.A., De Maio, F.A., Samsa, M.M., Alvarez, C. Gamarnik, A.V. (2015). Dengue Virus Uses a Non-Canonical Function of the Host GBF1-Arf-COPI System for Capsid Protein Accumulation on Lipid Droplets. *Traffic*, 16, 962-7.
- Itabe, H., Yamaguchi, T., Nimura, S. e Sasabe, N. (2017). Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids in Health and Disease* 16:83.
- Jones, C.T., Ma, L., Burgner, J.W., Groesch, T. D., Post, C.B. e Kuhn, R.J. (2003). Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein. *Journal of Virology* 77, 7143–7149.
- Jordan, T.X., Randall, G. (2017). Dengue Virus Activates the AMP Kinase-mTOR Axis To Stimulate a Proviral Lipophagy. *J Virol.* 91, e02020-16.
- Kimmel, A.R. e Sztalryd C. (2016). The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization and Systemic Homeostasis. *The Annual Review of Nutrition* 36, 471-509.
- Kimmel, A.R., Brasaemle, D.L., McAndrews-Hill, M., Sztalryd, C., Londos, C. (2010). Adoption of Perilipin as a unifying nomenclature for the mammalian PAT family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res.* 51, 468-71.
- Leong, A.S., Wong, K.T., Leong, T.Y., Ph, T. e Wannakrairo, P. (2007). The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin Diagn Pathol*, 24, 227-36.
- Leta, S., Beyene, T.J., De Clercq, E.M., Amenu, K., Kraemer, M.U.G. e Revie, C.W. (2018). Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect Dis.* 67, 25-35.
- Ma, L., Jones, C.T., Groesch, T.D., Kuhn, R.J. e Post, C.B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *PNAS* 101, 3414–3419.
- Martins, A.S., Martins, I.C. e Santos, N.C. (2018). Methods for Lipid Droplet Biophysical Characterization in *Flaviviridae* Infections. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Melo, R. C.N., D'Avila, H., Hsiao-ChingWan, Bozza, P.T., Dvorak, A.M. e Weller, P.F. (2011). Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function, and Current Imaging Techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59, 540-556.
- Póvoa, T.F., Alves, A.M., Oliveira, C.A., Nuovo, G.J., Chagas, V.L. e Paes, M.V. (2014). The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One*.
- Saka HA e Valdivia R. (2012). Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28, 411-437.
- Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., Bozza, P.T. e Gamarnik, A.V. (2009). Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoSPathog* 5, e1000632.
- Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde (2018). Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 34 de 2018. *Boletim Epidemiológico* volume 49.
- Shang, Z., Song, H., Shi, Y., Qi, J. e Gao, G.F.(2018). Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. *Journal Of Molecular Biology* 7, 948-962.
- Skinner, J.R., Shew, T.M., Schwartz, D.M., Tzekov, A., Lepus, C.M., Abumrad, N.A. e Wolins, N.E. (2009). Diacylglycerol Enrichment of Endoplasmic Reticulum or Lipid Droplets Recruits Perilipin 3/TIP47 during Lipid Storage and Mobilization. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 30941–30948.

Vogt, D.A., Camus, G., Herker, E., Websterl, B.R., Tsoul, C.L., Greene, W.C., Yen, T,S.B. e Ott, M. (2012). Lipid Droplet-Binding Protein TIP47 Regulates Hepatitis C Virus RNA Replication through Interaction with the Viral NS5A Protein. *PloS Pathogens* 9, e100303302

Waterborg, J.H. (2002). The Lowry Method for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook* 2.

Welte, M.A. (2015). Expanding Roles for Lipid Droplets. *Cell Press* 25, R470–R481.

Wilfling, F., Haas, J.T., Walther, T.C. e Farese Jr, R.V. (2014). Lipid Droplet Biogenesis. *CurrOpin Cell Biol* 29, 39-45.

Zeidler, J.D., Fernandes-Siqueira, L.O., Barbosa, G.M e Da Poian, A.T. (2017). Non-Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. *Viruses* 9, 42.