

ARTHUR BARUEL ZANETI

Orientador: Profa Dra Silvia Beatriz Boscardin

Análise da resposta humoral induzida pela infecção com o vírus Dengue utilizando proteínas recombinantes do envelope deste vírus produzidas em sistema eucarioto ou procarioto.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2019

## Versão parcial

### RESUMO

ZANETI, A.B. **Análise da resposta humoral induzida pela infecção com os vírus Dengue e Zika utilizando proteínas recombinantes do envelope destes vírus.** [100 páginas. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2019.

Os *Flaviviridae* são uma família de vírus de RNA transmitidos principalmente por artrópodes que podem infectar seres humanos. Os membros dessa família causam um grande número de infecções e apresentam considerável morbidade e mortalidade. No Brasil, temos a circulação do vírus Dengue (DENV), presente no país há décadas sendo responsável por diversas epidemias recorrentes, além de outros *Flavivirus*, como o vírus da febre amarela (YFV) e, mais recentemente, vírus Zika (ZIKV). Os quatro sorotipos de DENV (DENV1- 4) apresentam aproximadamente 65% a 70% de similaridade em sua sequência de aminoácidos, o que pode ter implicações em sua patogênese, com a amplificação de infecções secundárias com sorotipos heterólogos do vírus através de imunocomplexos entre o vírus e anticorpos sub-neutralizantes, ou em sua proteção, com a indução de anticorpos neutralizantes de reatividade cruzada. Justifica-se então a necessidade de se utilizar proteínas recombinantes de DENV que representem de forma realista as proteínas nativas do vírus em estudos que visam analisar a resposta humoral induzida em infecções pelo DENV. Entre as alternativas de sistemas de expressão de proteínas recombinantes, o sistema de células de inseto tem se mostrado efetivo por gerar proteínas mais similares às nativas quando comparado ao sistema de expressão em bactérias. Por isso, em nosso trabalho produzimos proteínas recombinantes do envelope (E) de DENV e também seus domínios: domínio I e II (EDI/II) e domínio III (EDIII) em células S2 de *Drosophila*. Com estas, avaliamos a reatividade cruzada do soro de pacientes previamente infectados pelo DENV contra as proteínas E de DENV2 e DENV3. Além disso, com estes soros também analisamos a resposta humoral gerada contra cada domínio (EDI/II e EDIII) da proteína E de DENV2 e avaliamos a capacidade de neutralização dos soros contra o DENV2. Por fim, comparamos as proteínas E recombinantes de DENV2 produzidas em células S2 ou bactérias. As proteínas produzidas em sistema eucarioto apresentaram uma conformação mais próxima à nativa e melhor especificidade e sensibilidade que as proteínas produzidas em sistema procarioto e, por isso, mostraram-se melhores alternativas para o estudo da resposta humoral induzida contra o DENV.

**Palavras-chave:** Dengue; Proteína do envelope; Células S2; Imunidade humoral.

## ABSTRACT

ZANETI, A. B. **Analysis of the humoral response induced by Dengue and Zika virus infection using recombinant proteins from the envelope of these viruses.** [100 p. Master Thesis (Parasitology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2019.

The *Flaviviridae* are a family of RNA viruses transmitted mainly by arthropods that may infect humans. Members of this family are responsible for a great number of infections, and present considerable morbidity and mortality all around the globe. In Brazil, we have the circulation of the dengue virus (DENV), which has circulated in the country for decades and is responsible for many recurrent epidemics, and also other *Flaviviruses*, such as the Yellow Fever virus (YFV), and more recently, the zika virus (ZIKV). The four serotypes of DENV (DENV1-4) are 65% to 70% similar in their aminoacid sequence, which may have important consequences for pathogenesis, with the amplification of secondary infections caused by a heterologous serotype through immunocomplexes of the virus and sub-neutralizing antibodies, or in protection, with the induction of cross-reactive neutralizing antibodies. Therefore, it is essential to use recombinant proteins that represent well the native virus proteins in studies analyzing the humoral immune response induced in DENV infections. Among the alternatives of protein expression systems, the insect cell system is effective because it generates proteins more similar to the native ones when compared to the bacterial expression system. For this reason, in our work we generated recombinant envelope (E) proteins of DENV and also its domains: domain I and II (EDI/II) and domain III (EDIII) in *Drosophila* S2 cells. With these, we evaluated the cross-reactivity of sera from previously DENV infected patients against the DENV2 and DENV3 E protein. Furthermore, with these sera, we also measured the humoral immune response against each domain (EDI/II and EDIII) of the DENV2 E protein, and evaluated the sera's neutralization capacity against DENV2. Lastly, we compared the DENV2 E recombinant proteins produced in S2 cells or in bacteria. The proteins produced in the eukaryotic system showed a conformation closer to the native one, and better specificity and sensitivity than the ones produced in the prokaryotic system, and therefore they're better alternatives for the study of the humoral immune response generated against DENV.

**Keywords:** Dengue; Envelope protein; S2 cells; Humoral immunity