UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão de proteínas recombinantes dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya para diagnóstico sorológico diferencial das viroses

Aline Sanches Pereira

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão de proteínas recombinantes dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya para diagnóstico sorológico diferencial das viroses

Aline Sanches Pereira

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão de proteínas recombinantes dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya para diagnóstico sorológico diferencial das viroses

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Aline Sanches Pereira

Orientadora: Profª. Drª. Elisa Maria de Sousa Russo

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 13/12/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pereira, Aline Sanches

Expressão de proteínas recombinantes dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya para diagnóstico sorológico diferencial das viroses. Ribeirão Preto, 2018. 94 p: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Russo, Elisa Maria de Sousa

1. Arbovirose. 2. Proteína Recombinante. 3. *Escherichia coli.* 4. Diagnóstico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Aline Sanches Pereira
Título do trabalho: Expressão de proteínas recombinantes dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya para diagnóstico sorológico diferencial das viroses

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profª Elisa Maria de Sousa Russo

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e depois as pessoas mais importantes da minha vida: meu pai, minha mãe e minha irmã, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

Agradecimentos

A Deus, pela presença constante em minha vida, por ser meu sustento, minha força e minha direção;

Aos meus pais, Arlindo Natal Pereira e Solange Sanches Pereira, por abraçarem todos os meus sonhos e pelos incontáveis esforços que fazem para que cada um deles se torne realidade. Agradeço pelas incansáveis orações, pelo amor sem medida, por serem meu porto seguro e meus maiores exemplos. Vocês são os grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui. Essa conquista também é de vocês!

A minha irmã, Maiara Sanches Pereira pelo seu amor, carinho e por alegrar a minha vida. Agradeço, principalmente, por guardar comigo o ensinamento transmitido pelos nossos pais: “sou eu por você e você por mim sempre”.

Ao meu cunhado, José Miguel Marchi Júnior, pelo incentivo, pela parceria, pelas conversas e pela disposição em me ajudar sempre que preciso;

A toda minha família, tios, tias, avós e primos, por todo o amor, por sempre torcerem muito por mim, por me auxiliarem durante toda a jornada e compartilharem comigo a alegria das conquistas;

A Profª. Drª. Elisa Maria de Sousa Russo, pela confiança para a realização desse trabalho e por estar sempre presente preocupando-se com a minha formação. Agradeço também pela amizade, paciência, encorajamento e pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal. Obrigada por ser esse grande exemplo!

Aos meus amigos de laboratório, Allana Ferreira da Costa Pessoa, Carlos Eduardo Ferareze Mendonça, Gabriel Antônio Nogueira, Giovanna Fondato de Souza, Nathália Cristina Canicoba, Nicole Castro Silva Nicolela, Patrícia Regina Moromisato de Oliveira e Pedro Henrique Daibert Garcia por tornarem meus dias mais felizes, pelos momentos divididos, pelas conversas, experimentos e, principalmente, pela amizade incrível que construímos;

Um agradecimento especial à Bruna Samhan Archangelo por todo o conhecimento que me transmitiu, por estar sempre tão disposta a me ajudar em todos os momentos. Devo muito a você e não há palavras que consigam expressar o meu agradecimento;

Ao Rafael Pedezzi por todos os ensinamentos e discussões fundamentais para a construção do trabalho;

À Thais Canassa pelas discussões de resultados e protocolos e por todo o auxílio;

À Profª. Drª. Cleni Mara Marzocchi Machado, pela convivência, pelo carinho e, principalmente, pelos momentos compartilhados;

Ao químico e grande amigo Luiz Fernando Fortunato Tucci, sempre presente em todos os experimentos e discussões;

A minha grande amiga Taís, que me incentivou arduamente e acompanhou durante o processo de preparo para a candidatura ao mestrado;

Ao meu amigo Leonardo Daniel Mendes por não desistir do meu sonho quando até mesmo eu estava desistindo;

A todos os meus queridos amigos de Ribeirão Preto por todos os momentos de convivência, pelo incentivo para que eu alcançasse o meu objetivo e por compartilharem tantos momentos comigo. Vocês fazem meus dias mais felizes;

Um agradecimento especial à minha amiga Ana Beatriz pelo apoio, incentivo e por compartilhar comigo momentos de alegria e tristezas;

Aos meus amigos mais antigos e de sempre, por me ensinarem que a distância não interfere nas amizades que nascem no coração;

Aos professores do Programa de Biociências e Biotecnologia da FCFRP-USP por auxiliarem no meu aprendizado e crescimento acadêmico;

Aos coordenadores e funcionários do Programa de Biociências e Biotecnologia da FCFRP-USP pela disposição em ajudar sempre;

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado;

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.”

John Ruskin

RESUMO

PEREIRA, A. S. **Expressão de proteínas recombinantes dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya para diagnóstico sorológico diferencial das viroses.** 2018. 94f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As arboviroses dengue, zika e chikungunya representam um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Elas circulam simultaneamente devido ao transmissor comum, vetores da classe *Aedes*, e são responsáveis por milhares de casos anuais no Brasil com consequências graves à população, levando à morte muitos indivíduos. Essas doenças possuem sintomas semelhantes, o que dificulta o diagnóstico clínico exato. O diagnóstico específico se mostra necessário para evitar o agravamento das consequências que cada uma pode trazer ao paciente. Os testes diagnósticos sorológicos disponíveis no mercado identificam uma única virose por vez. Os testes discriminatórios são, normalmente, moleculares utilizando PCR em tempo real. Tais métodos são excelentes, mas inadequados para o diagnóstico em massa devido ao custo. Devido a todos os riscos de morte ou de sequelas permanentes que esses vírus impõem aos indivíduos, um diagnóstico discriminatório se faz necessário e melhorias nos conjuntos diagnósticos são desejáveis.Os genes das proteínas ZIKVNS1, DENVNS1, DENVE3 e CHIKVE2 foram clonados com sucesso em diferentes linhagens de *Escherichia coli*, porém a proteína CHIKVE2 não foi expressa em nenhuma das linhagens. As proteínas ZIKVNS1, DENVNS1 e DENVE3 foram produzidas em bactérias da linhagem *Rosetta(DE3)* transformada com vetores pET28a recombinantes. Essas três proteínas foram solubilizadas dos corpos de inclusão, purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel e identificadas pelas técnicas de SDS-PAGE e *Western Blotting*. A proteína DENVNS1 foi reconhecida em teste rápido comercial para detecção de antígenos NS1 da dengue o que confere a ela especificidade e grande potencial como antígeno de captura para diagnóstico. Neste trabalho foram produzidas as proteínas recombinantes DENVNS1, ZIKVNS1 e DENVE3 em *E. coli.* Este é o primeiro passo para produção de um dispositivo diagnóstico rápido, discriminatório, unificado, produzido com tecnologia nacional, reduzindo os gastos com a importação destes produtos e ampliando o alcance diagnóstico.

Palavras-chave: Proteína recombinante; Arboviroses; Diagnóstico; *Escherichia coli*.

ABSTRACT

PEREIRA, A. S. **Expression of recombinant protein from Dengue, Zika and Chikungunya viruses to differential serological diagnosis.** 2018. 94f. Dissertation (Master) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The arboviruses dengue, zika and chikungunya represent a serious public health problem in Brazil and in the world. They circulate simultaneously due to the common vector, Aedes mosquito, and are responsible for thousands of annual reports of infections in Brazil with serious consequences as death of many individuals. These diseases have similar symptoms which impair the exact clinical diagnosis. The specific diagnosis is necessary to avoid aggravating the consequences that each one can bring to the patient. Serological diagnostic tests available on the market identify a single virus at time. Discriminatory tests are molecular assays like real time PCR. Such methods are excellent but inadequate for mass diagnosis due to cost. Because of the risks of death or sequels that these viruses impose on individuals, a discriminatory diagnosis is necessary, and the improvement of tests is desired. The genes of the proteins ZIKVNS1, DENVNS1, DENVE3 and CHIKVE2 were successfully cloned in different strains of *Escherichia coli*, but the CHIKVE2 protein was not expressed in any of the strains. ZIKVNS1, DENVNS1 and DENVE3 proteins were produced in Rosetta (DE3) bacteria transformed with pET28a recombinant vectors. These three proteins were solubilized from inclusion bodies, purified by nickel affinity chromatography and identified by SDS-PAGE and Western Blotting. The DENVNS1 protein was recognized in a rapid test for detection of dengue NS1 antigens, which gives it specificity and great diagnostic potential as capture antigen. In this work the recombinant proteins DENVNS1, ZIKVNS1 and DENVE3 were successfully expressed in *E. coli* system and this is the first step in the production of a fast, discriminatory, unified diagnostic device produced with national technology, reducing the costs of importing these products. These rapid tests can broad the diagnostic cover.

Keywords: Recombinant protein; Arboviruses; Diagnostic; *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da organização do genoma dos flavivírus 16

Figura 2. Ciclo replicativo dos flavivírus 18

Figura 3. Evolução clínica e laboratorial da dengue 20

Figura 4. Estrutura do genoma do vírus chikungunya 23

Figura 5. Ciclo replicativo dos *Alphavírus* 24

Figura 6. Mapa e região múltipla de clonagem do vetor pET28a 28

Figura 7. Amplificação das sequências DENVNS1 e DENVE3 45

Figura 8. Amplificação da sequência CHIKVE2 46

Figura 9. Amplificação da sequência ZIKVNS1 47

Figura 10. Digestão do plasmídeo recombinante pET28a_ZIKVNS1 48

Figura 11. Digestão do plasmídeo recombinante pET28a_CHIKVE2 49

Figura 12. Identificação de clones recombinantes de DENVNS1 e DENVE3 em pET28a 50

Figura 13. Sequenciamento do fragmento codificante para a proteína DENVNS1 52

Figura 14. Sequenciamento do gene da proteína DENVE3 recombinante 54

Figura 15. Sequenciamento do gene da proteína ZIKVNS1 55

Figura 16. Teste de expressão da DENVNS1 a 37º C em Rosetta(DE3) 59

Figura 17. Teste de expressão da ZIKVNS1 a 37º C em Rosetta(DE3) 60

Figura 18. Teste de expressão da DENVE3 a 37º C em Rosetta(DE3) 61

Figura 19. Teste de expressão da CHIKVE2 a 37º C em Rosetta(DE3) 62

Figura 20. Purificação da proteína DENVNS1..... 63

Figura 21. Purificação da proteína ZIKVNS1 64

Figura 22. Purificação da proteína DENVE3 65

Figura 23. Purificação da proteína CHIKVE2 66

Figura 24. Membrana de nitrocelulose mostrando o resultado de *Western Blotting* das proteínas recombinantes expressas em *E. coli* 68

Figura 25. Teste imunocromatográfico rápido para detecção do antígeno NS1 do vírus Dengue 69

Figura A1. Identificação de clones recombinantes de DENVE3

Figura A2. Amplificação das sequências DENVNS1, DENVE3 e ZIKVNS1

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – *Primers* específicos. 33

Tabela 2 – Condições de reação de dupla digestão dos gene que codifica a proteína CHIKVE2 e do vetor de expressão pET28a. 34

Tabela 3 – Condições de reação de dupla digestão dos genes que codificam as proteínas DENVNS1, DENVE3 e ZIKVNS1 e do vetor pET28a..... 35

Tabela 4 – Condições de reação de ligação dos insertos CHIKVE2, DENVNS1, ZIKVNS1 e DENVE3 ao vetor de expressão pET28a. 36

Tabela 5 – Distribuição dos códons raros nas sequências de DENVNE3, DENVNS1, CHIKVE2 e ZIKVNS1 58

Tabela 6 – Concentração de proteínas presentes nas frações purificadas das proteínas ZIKVNS1, DENVNS1, DENVE3 e CHIKVE2 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus Dengue
DENV-1	Vírus Dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus Dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus Dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus Dengue sorotipo 4
DENV-5	Vírus Dengue sorotipo 5
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
Fw	*Forward*
HCl	Ácido clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kb	Kilobase
LB	Caldo Luria Bertani
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio

NaH_2PO_4	Fosfato de sódio monobásico
NS1	Proteína Não-estrutural 1 (do inglês, *Nonstructural Protein 1*)
NS2A	Proteína Não-estrutural 2A (do inglês, *Nonstructural Protein 2A*)
NS2B	Proteína Não-estrutural 2B (do inglês, *Nonstructural Protein 2B*)
NS3	Proteína Não-estrutural 3 (do inglês, *Nonstructural Protein 3*)
NS4A	Proteína Não-estrutural 4A (do inglês, *Nonstructural Protein 4A*)
NS4B	Proteína Não-estrutural 4B (do inglês, *Nonstructural Protein 4B*)
NS5	Proteína Não-estrutural 5 (do inglês, *Nonstructural Protein 5*)
NTR	Região não-traduzida (do inglês, *non translated region)*
ORF	Quadro aberto de leitura (do inglês, *Open Reading Frame*)
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia mediada pela polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RBS	Sítio de ligação ao ribossomo (do inglês, *ribosome binding site*)
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	*Reverse transcription polymerase chain reaction*
Rv	*Reverse*
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SE	Semana Epidemiológica
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBS	Tampão salina Tris
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas v
Lista de abreviaturas e siglas vi
Lista de símbolos viii

1 Introdução 15
1.1 Flavivírus 16
1.1.1 Dengue 18
1.1.2 Zika 21
1.2 Alphavirus 22
1.2.1 Chikungunya 25
1.3* Produção de proteínas heterólogas em *Escherichia coli 25
1.4 Diagnóstico 29
2 Justificativa 30
3 Objetivos 31
3.1 Objetivo Geral 31
3.2 Objetivos Específicos/Metas 31
4. Materiais e Metodologia 32
4.1. Fluxograma 32
4.2. Construção do Plasmídeo Recombinante 32
4.3. Preparo de células de *E. coli* competentes 36
4.4. Sequenciamento nucleotídico da região codificadora da proteína recombinante de interesse 37
4.5. Transformação das construções em linhagens de *E. coli BL21(DE3)pLySs, BL21(DE3), Rosetta (DE3)* 38
4.6. Expressão em *BL21(DE3) e BL21(DE3)pLySs* 38
4.7 Testes de expressão em *Rosetta(DE3)* 39
4.8 Expressão das proteínas recombinantes em maior escala 40
4.9 Purificação 41
4.10 Quantificação de proteínas 41

4.11 **Detecção das proteínas recombinantes por *Western Blotting* 42**
4.12 Detecção da proteína recombinante DENVNS1 por Teste imunocromatográfico rápido 43
5 Resultados e Discussão 44
5.7 Clonagem dos fragmentos codificantes das proteínas DENVNS1, DENVE3, ZIKVNS1 e CHIKVE2 em vetor pET28a 44
5.2 Análise do Sequenciamento 51
5.3 Expressão 56
5.3.1 Teste de expressão 58
6 Purificação 62
7 Quantificação de proteínas 66
***8* Imunodetecção das proteínas recombinantes por *Western Blotting*.. 67**
9 Detecção da proteína recombinante DENVNS1 por Teste imunocromatográfico rápido 68
10. Conclusão 70
11. Referencial bibliográfico 71
ANEXO 78

1 Introdução

As arboviroses, infecções virais que têm causado grande preocupação em todo o mundo, são causadas por arbovírus e ocorrem sobretudo nos países tropicais e subtropicais, cujas condições climáticas favorecem a proliferação do seu principal vetor.

Os arbovírus – do inglês *ARthropod-BOrne VIRUS* – são vírus transmitidos por artrópodes, porém recebem essa designação não apenas por sua veiculação, mas, principalmente, pelo fato de parte de seu ciclo replicativo ocorrer nos insetos (LOPES et al, 2014). O termo arbovírus não é utilizado para a classificação taxonômica destes vírus, mas agrupa-os ecologicamente levando em consideração sua transmissão na natureza (WHO, 1985).

Dentre as mais de 545 espécies de arbovírus conhecidas, mais de 150 relacionam-se com doenças em seres humanos (LOPES et al, 2014). Sendo que as famílias *Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae* são as que possuem a maioria dos vírus de importância para a saúde humana (GUBLER, 2001).

Os arbovírus são mantidos em ciclo de transmissão entre artrópodes (vetores) e reservatórios vertebrados como principais hospedeiros amplificadores (CLETON et al., 2012; GUBLER, 2001)

Mosquitos do gênero *Aedes*, especificamente *A. aegypti* e *A. albopictus*, são os grandes responsáveis pela transmissão dos arbovírus em todo o mundo. Apesar de suas prováveis origens como zoonoses, os seres humanos se tornaram o principal hospedeiro amplificador desses vírus, particularmente em ambientes urbanizados. A forma de transmissão mais comum ocorre quando um mosquito pica um indivíduo infectado e, em seguida, transporta o vírus diretamente para outra pessoa (WINDER-SMITH et al, 2017).

O mosquito *A. aegypti* tem sido tradicionalmente considerado um vetor muito mais eficiente para a propagação dessas doenças devido a vários fatores, principalmente por sua estreita proximidade com hospedeiros humanos e sua preferência por ambientes urbanos. O *A. albopictus* vive em ambiente mais variado podendo ser encontrado em áreas rurais ou peri-urbanas, de clima mais ameno (WINDER-SMITH et al, 2017).

As arboviroses são um grande problema de saúde pública devido ao impacto econômico e social. O aumento do número de casos de infecções por arbovírus tem

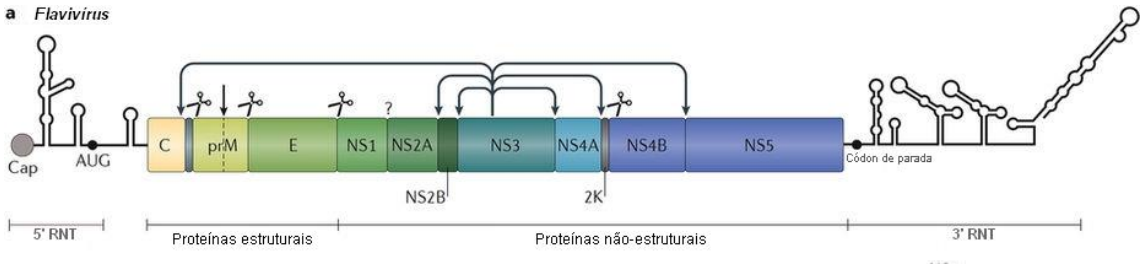
sido causado devido a diversos fatores como, por exemplo, o crescimento urbano desordenado, a adaptação de vetores ao meio urbano, processos de globalização (facilidade de deslocamento de pessoas), alterações climáticas e precariedade das condições sanitárias (LIMA-CAMARA, 2016).

1.1 Flavivírus

O gênero Flavivírus pertence à família *Flaviviridae* e compreende alguns dos principais arbovírus patogênicos humanos em todo o mundo como os vírus da Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Febre Amarela.

A partícula dos Flavivírus mede aproximadamente 50 nm, é envelopada e possui como material genético uma fita de RNA simples de polaridade positiva. O genoma viral tem 11 kb com uma única fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) flanqueada por duas regiões não codificantes (*nontranslated region* – NTR), que codifica uma poliproteína (Figura 1). Esta poliproteína, depois de clivada por proteases celulares e virais, gera três proteínas estruturais [C (capsídeo), prM/M (pré-membrana/membrana) e E (envelope)] e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (HASAN et al., 2018).

Figura 1: Esquema da organização do genoma dos Flavivírus. As tesouras indicam os pontos de clivagem da poliproteína por peptidases celular, as setas denotam a clivagem por proteases virais, enquanto que a seta vertical preta indica clivagem pela furina residente no Golgi. O ponto de interrogação indica o ponto de clivagem realizada por uma protease desconhecida.

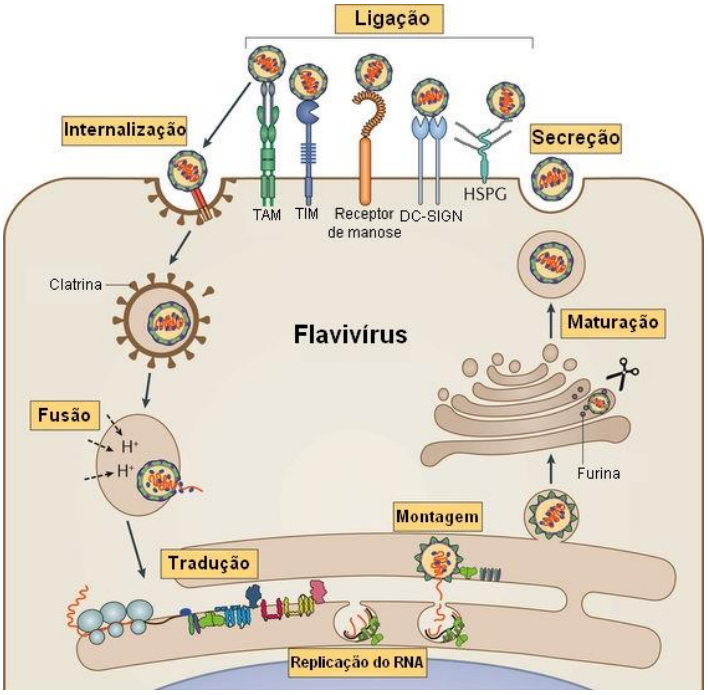


Fonte: Adaptado de Neufeldt et al (2018).

As partículas virais dos flavivírus ligam--se a receptores específicos na membrana da célula hospedeira através da proteína do envelope viral (proteína E).

Após essa ligação as partículas virais são internalizadas por endocitose, predominantemente, através de uma via dependente de clatrina (NEUFELDT et al., 2018). O endossoma formado possui baixo pH que induz rearranjos conformacionais na proteína do envelope permitindo a fusão do envelope lipídico da partícula viral com a membrana do endossoma, o que resulta na desmontagem do vírus e a liberação de seu RNA no citoplasma (LINDENBACH; THIEL, H J; RICE, 2007). No citoplasma, o RNA viral é reconhecido pelos ribossomos e traduzido em uma poliproteína. Em seguida, proteases virais e celulares processam a poliproteína em proteínas estruturais e não estruturais. Após o processamento da poliproteína viral, o complexo replicativo composto por proteínas não estruturais do vírus é montado na membrana do retículo endoplasmático (RE) e a replicação viral é iniciada. A replicação é semiconservativa, onde o RNA de polaridade positiva serve como modelo para a síntese da molécula de RNA de polaridade negativa para que assim sejam gerados outros RNAs de polaridade positiva. Depois da replicação, a montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE) resultando em um vírus imaturo, não infeccioso, que é transportado através das redes de Golgi. O pH ácido na rede trans-Golgi (TGN) provoca um rearranjo das proteínas do envelope e a clivagem proteolítica de prM em pr e M pela protease celular furina (LINDENBACH; THIEL, H J; RICE, 2007). As partículas virais maduras são liberadas principalmente por exocitose (Figura 2) (NEUFELDT et al., 2018; MUKHOPADHYAY et al., 2006).

Figura 2: Ciclo Replicativo dos Flavivírus



Fonte: Adaptado de Neufeldt et al (2018)

1.1.1 Dengue

A dengue é uma doença infecciosa, debilitante, causada pelo vírus Dengue (DENV) que possui quatro sorotipos antigenicamente distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, transmitidos ao homem através da picada de mosquitos do gênero Aedes, principalmente o *Aedes aegypti*, presentes nas áreas tropicais e subtropicais (GUBLER; CLARK, 1995). Esses quatro sorotipos são geneticamente semelhantes e partilham aproximadamente 65% dos seus genomas (GUZMAN et al., 2010). Um subtipo, o DENV-5, é a mais recente adição aos sorotipos de Dengue existentes e foi anunciado em Outubro de 2013, na Malásia (MUSTAFA et al., 2014).

Há relatos na literatura que o vírus Dengue foi isolado pela primeira vez no Japão, de soldados japoneses acometidos de doença febril (KIMURA; HOTTA, 1944). Os isolamentos foram realizados através da inoculação de amostras de sangue em camundongos. Os primeiros isolados foram denominados DENV-1 e o isolado de Nova Guiné foi denominado DENV-2. O DENV-3 e o DENV-4 foram isolados em 1956, nas Filipinas (HAMMON et al., 1960).

Segundo o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde − Ministério da Saúde, no ano de 2018, foram registrados 203.157 casos prováveis de dengue no Brasil, até a Semana Epidemiológica (SE) 36 (31/12/2017 a 08/09/2018), destes 126.889 (62,5%) foram confirmados. Nesse período foram confirmados 229 casos de dengue grave e 2.467 casos de dengue com sinais de alarme. Ocorreram nesse mesmo período 108 óbitos por dengue (BRASIL, 2018). Atualmente, o controle de vetores é o método mais eficaz para prevenção e controle da dengue e dengue hemorrágica.

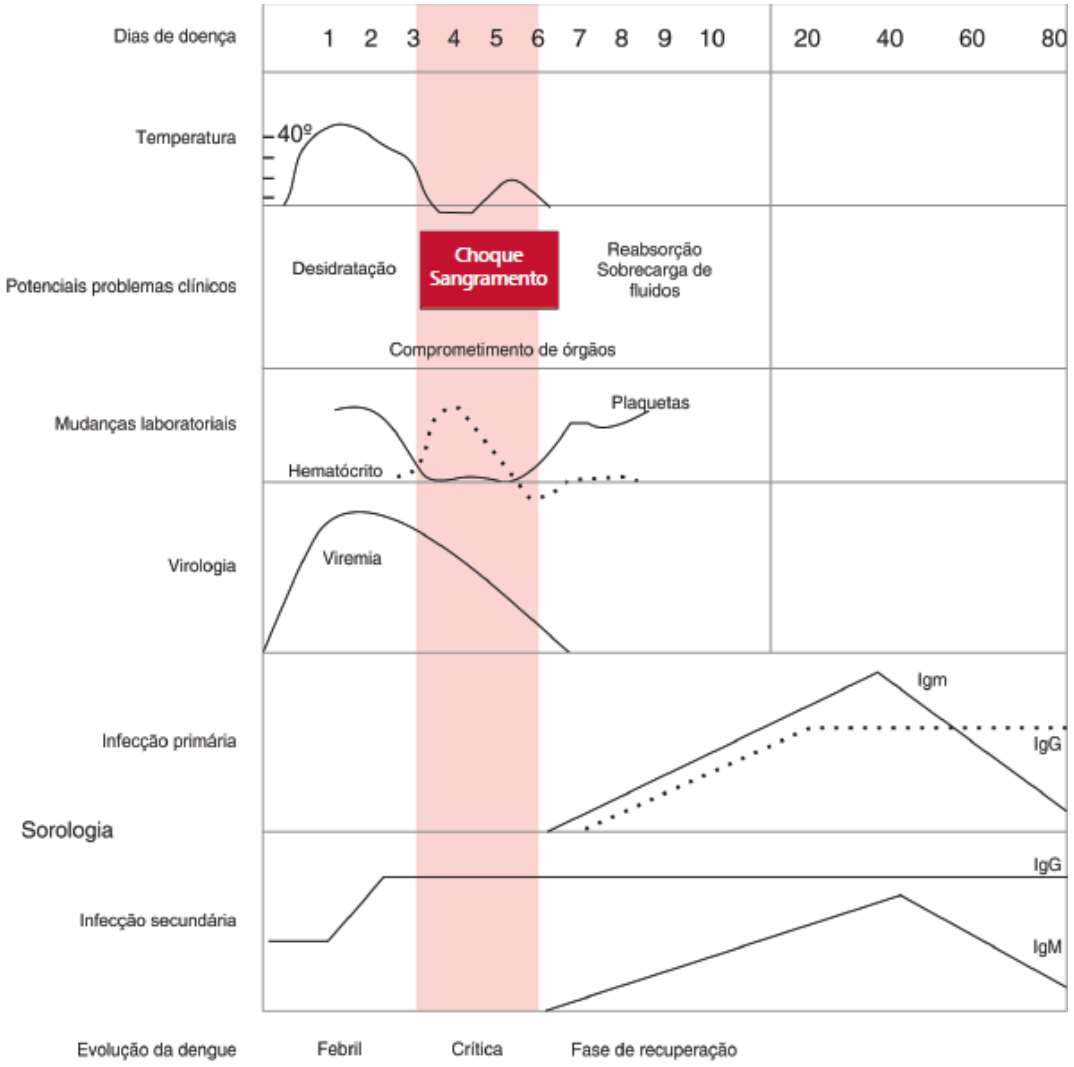
A primeira vacina licenciada para a prevenção da dengue, a Dengvaxia®, é uma vacina quimérica tetravalente com vírus atenuado e foi desenvolvida por Sanofi Pasteur. Porém, vários estudos indicam que a eficácia e a segurança dessa vacina ainda necessitam de avaliações adicionais (HADINEGORO et al., 2015; HALSTEAD, 2017; LIU; LIU; CHENG, 2016).

A produção de uma vacina segura e eficaz contra o vírus da dengue enfrenta grandes obstáculos, principalmente, a dificuldade em compreender o complexo conjunto de interações de antígenos do vírus da dengue em hospedeiros humanos. Ademais, a eficácia pode ser comprometida porque a vacina pode não ser capaz de oferecer proteção contra novos sorotipos existentes no ciclo silvestre que possam ser capazes de infectar seres humanos. Por isso, o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue deve ser visto apenas como um complemento a outras medidas de saúde pública tais como o controle dos vetores, mobilização social e gestão ambiental e epidemiológica (HALSTEAD, 2017; LIU; LIU; CHENG, 2016).

As ferramentas utilizadas para o diagnóstico dessa virose são os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Apesar do quadro clínico (como febre e manifestações hemorrágicas) e dos dados epidemiológicos auxiliarem no diagnóstico de infecção pelo vírus da dengue, esta só pode ser confirmada através de testes laboratoriais (BRASIL, 2016). Estes testes dependem da detecção de anticorpos séricos específicos, do isolamento do vírus a partir de material biológico, da detecção do vírus por RNA viral ou de antígenos virais (como o NS1). Dentre estes testes estão a inibição de hemaglutinação (IH), teste de neutralização (TN), RT- PCR e ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgM e IgG (GUBLER, 1998). O antígeno viral NS1 é uma proteína que, durante a fase inicial da infecção, está presente em altas concentrações no soro de pacientes infectados com o vírus da dengue, podendo ser detectado até o 5º dia a partir do início dos sintomas. Os

anticorpos do tipo IgM e IgG são produzidos pelo sistema imune contra o vírus da dengue a fim de combater a infecção. Portanto, testes de sorologia devem ser solicitados a partir do 6º dia após o aparecimento dos sintomas (BRASIL, 2016). Na figura 3 podemos observar que o anticorpo IgM é produzido cinco a seis dias após o início da infecção e que anticorpos do tipo IgG começam a ser produzidos entre o 7º e o 10º dia. Por isso, o período mais adequado para realização da sorologia será a partir do quinto/sexto dia de doença.

Figura 3: Evolução clínica e laboratorial da dengue



Fonte: BRASIL, 2016

O hemograma é indicado como auxiliar diagnóstico e para o acompanhamento da evolução da doença. Achados comuns nesse tipo de exame em pacientes com dengue são leucopenia e trombocitopenia.

1.1.2 Zika

O Zika Vírus (ZIKV) foi identificado pela primeira vez em 1947, em macacos rhesus na floresta de Uganda. E sua primeira identificação em seres humanos ocorreu na Nigéria, em 1968. Sua infecção é causada pela picada de um mosquito *Aedes* infectado, geralmente causando febre baixa, exantema, conjuntivite e dor muscular. No Brasil, em maio de 2015, a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) emitiu um alerta sobre as infecções por vírus Zika (FIOCRUZ, 2018). Em 2016, o Brasil experimentou uma grande epidemia de zika com 128.266 casos confirmados (BRASIL, 2017).

O vírus existe há vários anos, mas somente no início do ano de 2015 foram registrados os primeiros casos confirmados de infecção do ZIKV no Brasil (VASCONCELOS, 2015). Apesar de ser uma infecção viral considerada leve e na maioria dos casos ser assintomática o ZIKV pode acometer o sistema nervoso central, sendo associado à síndrome de Guillian-Barré e microcefalia. A associação da infecção pelo ZIKV com a microcefalia e desordens neurológicas fez com que a World Health Organization (WHO) decretasse uma emergência global no combate à Zika (WHO, 2016).

Além da transmissão do Zika vírus de uma pessoa para outra através da picada de um mosquito Aedes infectado, há relatos de diferentes formas de transmissão do virus. Há descrição de possível propagação do vírus por transfusão de sangue (MUSSO; GUBLER, 2016; WHO, 2016) e relatos de propagação do vírus através do contato sexual (MANSUY et al., 2016). A transmissão intraparto do Zika vírus também foi relatada, mas o mecanismo preciso ainda é desconhecido (COLT et al., 2017). Em 2015, o RNA do vírus Zika foi detectado no líquido amniótico de dois fetos, indicando a capacidade de cruzar a barreira placentária podendo causar uma infecção vertical (BRITO; CORDEIRO, 2016; CALVET et al., 2016), contudo a A transmissão vertical não está confirmada. Estudos demonstraram a presença do vírus em secreções vaginais e a transmissão sexual do vírus da mulher para o

homem (GREGORY et al, 2017). O período de incubação do ZIKV pode variar de 3 a 12 dias após a picada do mosquito.

Não há vacina ou tratamento específico para o ZIKV. O exame laboratorial específico para o diagnóstico da infecção pelo ZIKV é a identificação do RNA viral no sangue do paciente. Os testes de ELISA ou de imunofluorescência são utilizados para a confirmação do diagnóstico do ZIKV (BRASIL, 2016).

O Ministério da Saúde, em Boletim Epidemiológico, relata que foi confirmada transmissão autóctone de febre pelo vírus Zika no país a partir de abril de 2015. Em 2018, até a SE 36, foram registrados 7.208 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país, destes 3.079 (42,7%) foram confirmados. Em relação às gestantes no país, no mesmo período de 2018, foram registrados 1.013 casos prováveis, sendo 383 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial (BRASIL, 2018).

1.2 Alphavirus

O gênero *Alphavirus* faz parte da família *Togaviridae* e compreende diversas espécies como o vírus Chikungunya (CHIKV), por exemplo. Eles foram identificados em muitas espécies diferentes de aves a peixes e mamíferos. Existem atualmente 31 membros distintos que são categorizados, não oficialmente, como vírus do mundo antigo ou vírus do novo mundo dependendo da identificação geográfica (MENDES; KUHN, 2018). Embora não seja uma regra, os vírus do velho mundo causam principalmente uma patologia artrítica, enquanto os novos vírus do mundo têm sido associados a uma maior probabilidade de encefalite. Esta classificação filogenética, no entanto, não corresponde à distribuição geográfica atual dos alfavírus (EYER-SILVA et al., 2016).

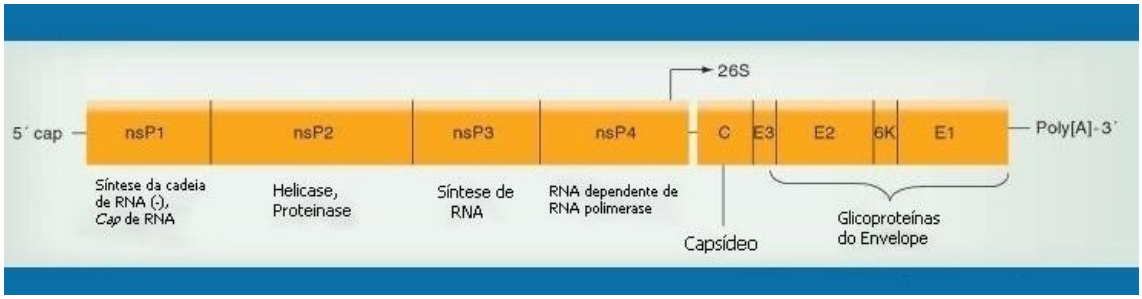
A partícula dos alfavírus é pequena e esférica medindo aproximadamente 70 nm de diâmetro. Possui um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope viral, onde se encontram as glicoproteínas E1 e E2 (MUKHOPADHYAY et al., 2006).

O genoma é composto por um RNA de fita simples do tipo linear e de polaridade positiva com aproximadamente 12 kb de comprimento. Contém dois quadros abertos de leitura (ORF) separados por uma sequência não-codificante curta. A extremidade 5’ é "capeada" onde são codificadas quatro proteínas não estruturais (nsP1 a nsP4), que estão envolvidas na replicação do RNA, enquanto na extremidade 3’, que é poliadenilada, são codificadas seis proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K, TF e E1)

importantes para a formação da partícula (FIGURA 4) (MUKHOPADHYAY et al., 2006).

A sequência de codificação consiste em dois grandes quadros de leitura aberta (ORF); a ORF N-terminal codifica a poliproteína não estrutural enquanto o ORF C-terminal codifica a poliproteína estrutural (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura do genoma do vírus Chikungunya



Fonte: Adaptado de (WEAVER et al., 2012)

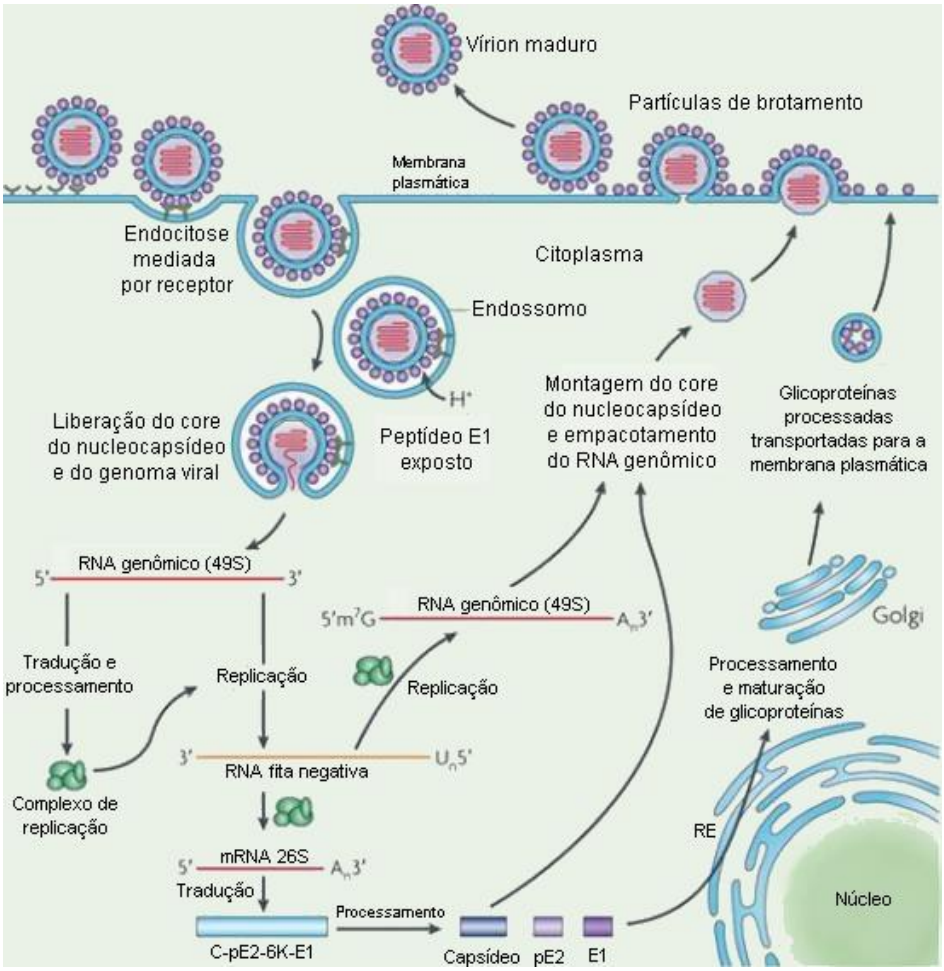
O ciclo replicativo dos *Alphavirus* é mostrado na figura 5. Inicialmente, as partículas virais ligam-se a receptores da célula hospedeira através da glicoproteína E2 do envelope viral. Em seguida, o vírus é internalizado por endocitose mediada por receptores numa via dependente de clatrina, embora a entrada independente da clatrina também tenha sido relatado (CARRASCO; SANZ; GONZALEZ-ALMELA, 2018).

No ambiente ácido do endossoma, o heterodímero E1-E2 sofre alterações conformacionais provocando a exposição de E1 e permitindo a fusão do envelope viral com a membrana endossomal e, consequentemente, a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula (CARRASCO; SANZ; GONZALEZ-ALMELA, 2018; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

O RNA viral livre no citoplasma celular é traduzido em uma poliproteína precursora que, após sofrer clivagens por proteases virais e celulares, origina quatro proteínas não estruturais. Essas proteínas se reúnem para formar um complexo de replicação viral que realiza a replicação do genoma viral e a transcrição do RNA, sintetizando um RNA de cadeia negativa intermediário com o comprimento total do genoma que servirá como molde para a síntese de RNA subgenômico (26S) e

genômico (49S). Após ser traduzido, o RNA subgenômico (26s) dá origem a poliproteína precursora das proteínas estruturais (C-pE2-6K-E1) que é processada em passos posteriores. O capsídeo (C) é liberado e as glicoproteínas E1 e pE2 se associam ao Golgi e são exportadas para a membrana plasmática, onde pE2 é clivada em E2 e E3. A montagem da partícula viral é promovida pela incorporação das cópias do RNA genômico pela proteína do capsídeo dando origem ao nucleocapsídeo que brota da membrana da célula hospedeira onde estão inseridas as glicoproteínas do envelope. As partículas de alfavírus montadas são liberadas (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Figura 5: Ciclo replicativo dos *Alphavírus*



Fonte: Adaptado de SCHWARTZ; ALBERT, 2010

1.2.1 Chikungunya

A doença foi relatada pela primeira vez em 1950 na região da Tanzânia. O significado de chikungunya vem da língua africana makonde que diz “aquele que é contorcido”, devido à forte dor nas articulações causada pela artrite que caracteriza a doença (TAUIL, 2014). No Brasil, a transmissão da chikungunya foi detectada em setembro de 2014. Os neonatos de mães infectadas pelo vírus podem contrair o CHIKV no período intraparto.

Seus sintomas podem ser confundidos com a febre dengue e sua fatalidade é relatada como 1:1000 infectados, principalmente perigosa para neonatos, idosos e indivíduos imunocomprometidos (LEMANT et al, 2008).

Embora os anticorpos específicos do tipo IgM possam aparecer a partir do 2º dia após o aparecimento dos sintomas, o período mais indicado para pesquisas de IgM é a partir do 5º dia. O hemograma é o exame laboratorial solicitado pelo médico para acompanhamento da doença e pode apresentar leucopenia e linfopenia durante a infecção. Outros testes bioquímicos como as transaminases, creatinina e eletrólitos são indicados para os pacientes em estado grave. Não há vacina ou tratamento específico contra o CHIKV, sua infecção é autolimitante.

O Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde − Ministério da Saúde relata que em 2018, até a SE 36, foram registrados 74.932 casos prováveis de febre de chikungunya no país, destes 52.613 (70,2%) foram confirmados. Foram confirmados 23 óbitos por febre de chikungunya, e 51 óbitos ainda permanecem em investigação (BRASIL, 2018).

1.3 Produção de proteínas heterólogas em *Escherichia coli*

A introdução da tecnologia do DNA recombinante permitiu que proteínas fossem expressas em vários organismos hospedeiros resultando em uma maneira mais rápida, fácil e eficiente de se conseguir quantidades suficientes de proteínas em comparação às suas fontes naturais. Essa tecnologia tem tido aplicações diversas na área biológica, médica, agrícola e química.

A tecnologia do DNA recombinante tem sido empregada na produção de vacinas, medicamentos, no diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas, dentre outros.

A escolha do organismo hospedeiro e do correspondente vetor de expressão depende dos objetivos do bioprocesso e, para tanto, devem ser considerados

fatores como as características da proteína a ser produzida, as taxas de crescimento da célula hospedeira, a necessidade de modificações pós-traducionais, a atividade biológica da proteína.

Existem vários sistemas para expressão heteróloga de proteínas, tanto em eucariotos como em procariotos. Os sistemas eucariotos podem ser leveduras (*P. pastoris*, por exemplo), plantas, insetos e células de mamíferos. No que diz respeito a organismos procariotos, destaca-se a expressão em *E. coli*.

O sistema de expressão em *E. coli* foi o primeiro a ser utilizado para produzir proteínas recombinantes e apresenta diversas vantagens como o rápido crescimento em meios de cultura de baixo custo, facilidade de cultivo, alto potencial de produção, genética bem descrita e inúmeras ferramentas biotecnológicas, como vetores bacterianos e cepas mutantes, capazes de aumentar a eficiência do sistema original, sendo, portanto, um sistema amplamente utilizado (BASSO et al., 2013). Entretanto, apresenta também algumas limitações, principalmente na produção de proteínas complexas devido à falta de maquinaria sofisticada para realizar modificações pós-traducionais. Algumas linhagens de *E.coli* podem apresentar ação de endotoxinas e proteases, que culminam com a degradação da proteína recombinante expressa (BANEYX; MUJACIC, 2004).

A rápida expressão de proteínas recombinantes pela *E. coli* pode não fornecer tempo hábil para o correto dobramento da proteína resultando na formação de agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão. Isso ocorre, muitas vezes, pelo uso de promotores fortes e altas concentrações de indutores que, apesar de permitir uma alta produção de proteína, em alguns casos afetam o dobramento correto da proteína (JEVSEVAR et al., 2005). Algumas estratégias podem ser utilizadas para evitar a formação dos corpos de inclusão. Uma delas é realizar a expressão em baixas temperaturas, o que resulta na diminuição da taxa de transcrição, tradução e redução das forças de interação hidrofóbicas, as quais contribuem para o dobramento incorreto da proteína. A fusão da proteína desejada à *tags* de fusão, como a proteína de ligação a maltose (MBP), pode atuar como potencializador de solubilidade (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Promotores fracos ou baixas concentrações de indutores também reduzem a taxa de síntese da proteína de interesse (JEVSEVAR et al., 2005). A coexpressão de chaperonas também pode auxiliar no correto dobramento das proteínas (KOLAJ et al., 2009; TERPE, 2006).

Em alguns casos, a formação de corpos de inclusão pode apresentar vantagens, especialmente se a proteína pode ser renovelada facilmente *in vitro*. Algumas dessas vantagens importantes são: a facilidade no isolamento, proteção contra proteólise no citoplasma, evitar toxicidade celular, uma vez que algumas proteínas na sua forma nativa podem ser tóxicas para a célula hospedeira (BANEYX; MUJACIC, 2004).

Há diversas linhagens de *E. coli* disponíveis para o processo de produção de proteínas heterólogas que podem ser utilizadas de acordo as características da proteína a ser expressa e do processo utilizado (BANEYX, 1999).

A linhagem de *E. coli* BL21 é a mais utilizada para expressão de proteínas recombinantes (GOPAL; KUMAR, 2013) devido à ausência de genes que codificam as proteases *lon* e *ompT* evitando a degradação proteolítica da proteína recombinante. A linhagem BL21(DE3) é lisogênica e muito utilizada no sistema pET de expressão. A designação (DE3) indica que as bacterias têm o gene que codifica a T7 RNA polimerase que é produzida sob controle do promotor lacUV5 quando este for induzido por IPTG. Sendo assim, a linhagem BL21(DE3) tem um gene codificador da T7 RNA polimerase introduzido em seu genoma bem como os genes para as proteases *lon* e *ompT* deletadas.

A *E. coli* BL21(DE3) pLysS carrega também o plasmídeo pLysS, que produz a T7 lisozima, que se liga a T7 polimerase e inibe a transcrição do promotor T7, controlando a expressão basal de proteínas recombinantes. Após a indução, a quantidade de T7 polimerase produzida supera o nível de polimerase que a lisozima T7 pode inibir permitindo a transcrição do gene recombinante. É uma bactéria muito utilizada para expressão de genes tóxicos (KAUR; KUMAR; KAUR, 2017; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

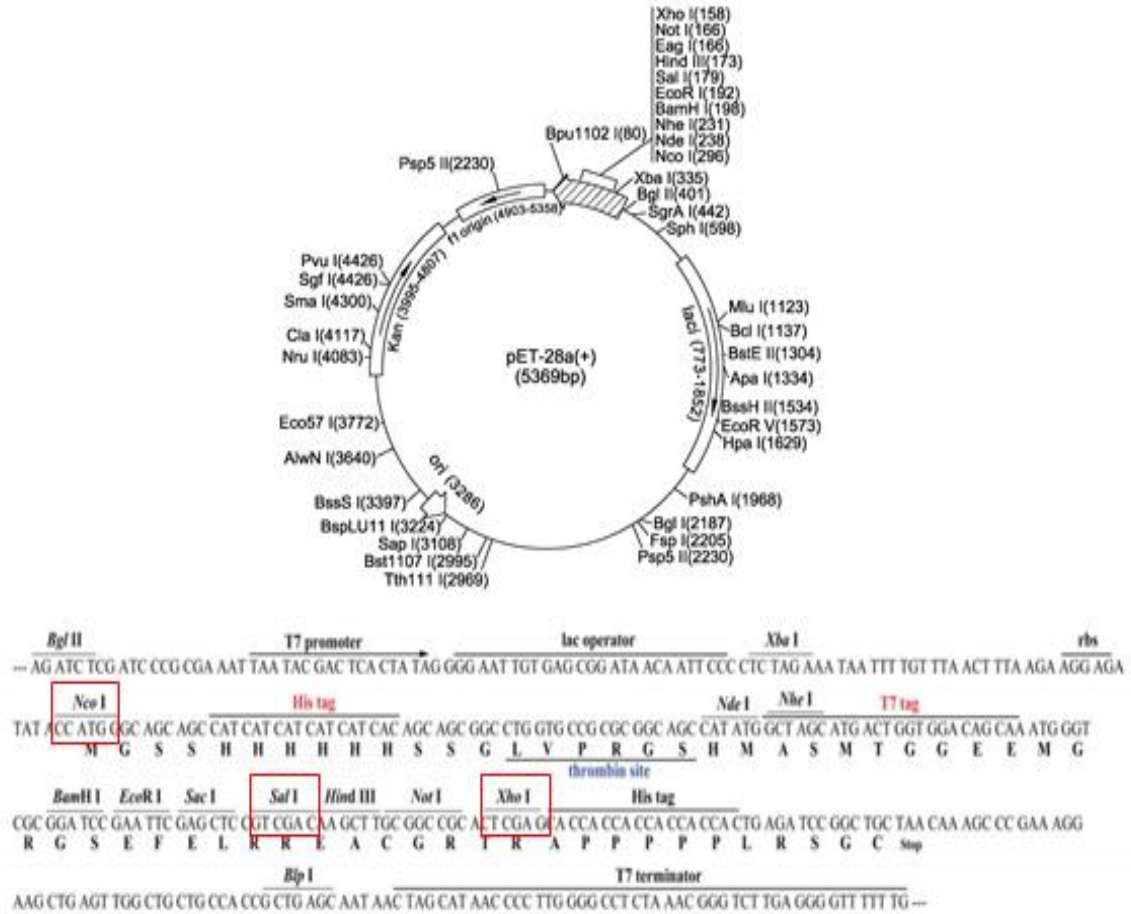
A linhagem Rosetta(DE3) é derivada da linhagem BL21(DE3) e plasmídeos que codificam tRNAs para os códons denominados códons raros compensando a escassez desses codons na linhagem BL21(DE3). Esses códons raros codificam para os seguintes aminoácidos: Isoleucina (AUA), Arginina (AGG e AGA), Leucina (CUA), Prolina (CCC) e Glicina (GGA) (GOPAL; KUMAR, 2013).

O sistema pET é muito utilizado para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. É um sistema comandado pelo promotor do fago T7, que é reconhecido pela RNA polimerase do fago (T7 RNA polimerase), mas não pela RNA polimerase da *E. coli*, e que promove a expressão após a indução com IPTG

(isopropiltiogalactosídeo), molécula análoga a lactose que é um indutor dos sistemas de expressão baseados no *operon lac.*

O vetor pET28a possui um gene que confere resistência a canamicina e apresenta uma sequência nucleotídica na região N- ou C- terminal do sítio de múltipla clonagem, denominada His-tag que codifica seis Histidinas (Figura 6). Assim, o gene de interesse pode ser clonado em fusão com esta sequência facilitando a purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade em coluna com resina contendo níquel. O vetor também apresenta um sítio de clivagem para trombina que é uma ferramenta útil para retirada da His-tag da região N-terminal, caso estas precisem ser retiradas após o passo de purificação (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Figura 6 - Mapa e região múltipla de clonagem do vetor pET28a. Destaque em retângulos vermelhos para os sítios de restrição das enzimas NcoI, SalI e XhoI, utilizadas nas clonagens.



1.4 Diagnóstico

As manifestações clínicas relacionadas com as arboviroses – zika, dengue e chikungunya - se apresentam de forma muito parecida, dificultando o diagnóstico clínico preciso e, consequentemente, o tratamento adequado para essas doenças (RODRÍGUEZ-MORALES, 2015). Desta forma, exames complementares são imprescindíveis para determinação de um diagnóstico conclusivo.

O diagnóstico laboratorial das arboviroses pode ser realizado por meio de isolamento do vírus, detecção do genoma viral e de antígenos e testes sorológicos que detectam anticorpos específicos. As principais metodologias utilizadas no diagnóstico das infecções por arbovírus são: a detecção de ácidos nucleicos virais por RT-PCR e a detecção de anticorpos específicos por ELISA (do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay). Outra ferramenta vantajosa são os testes rápidos, sendo os imunocromatográficos mais utilizados estes possibilitam triagem rápida e barata. Cada metodologia possui limitações e alguns se encontram mais adaptados à rotina laboratorial de diagnóstico.

No Brasil, o teste rápido imunocromatográfico para detecção de zika, o Zika IgG/IgM Combo, produzido pela *Bahiafarma* é distribuído pelo SUS (Sistema Único de Saúde) para todo o país desde janeiro de 2017. Recentemente, testes rápidos para a detecção de dengue (IgM/IgG) e para Chikungunya (IgM) também passaram a integrar oficialmente a lista de procedimentos do SUS e a ser disponibilizados aos estados e municípios.

2 Justificativa

Os surtos das três febres (dengue, chikungunya e zika) são normalmente simultâneos por possuírem o mesmo vetor de transmissão. As doenças possuem manifestações clínicas semelhantes que representam um desafio no diagnóstico clínico. Os testes laboratoriais (hemograma, enzimas) não são discriminatórios e os testes moleculares possuem um alto custo, inviabilizando o seu uso no diagnóstico de massa, importante no sistema de saúde público.

Os testes diagnósticos imunoenzimáticos utilizados para diagnóstico das viroses alvo desse projeto são, na sua maioria, de produção estrangeira. As importações dos sistemas diagnósticos elevam sobremaneira os gastos com saúde pública.

Devido a todos os riscos de morte ou de sequelas que esses vírus impõem aos indivíduos, um diagnóstico rápido, discriminatório e unificado se faz necessário. As técnicas de clonagem e expressão dessas proteínas recombinantes permitem caracterizar e produzir antígenos buscando o desenvolvimento de testes diagnósticos que tem a capacidade de ampliar a cobertura diagnóstica, especialmente em pronto atendimentos, regiões remotas e de difícil acesso ou mesmo em áreas onde o laboratório tem menor desenvolvimento tecnológico .

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

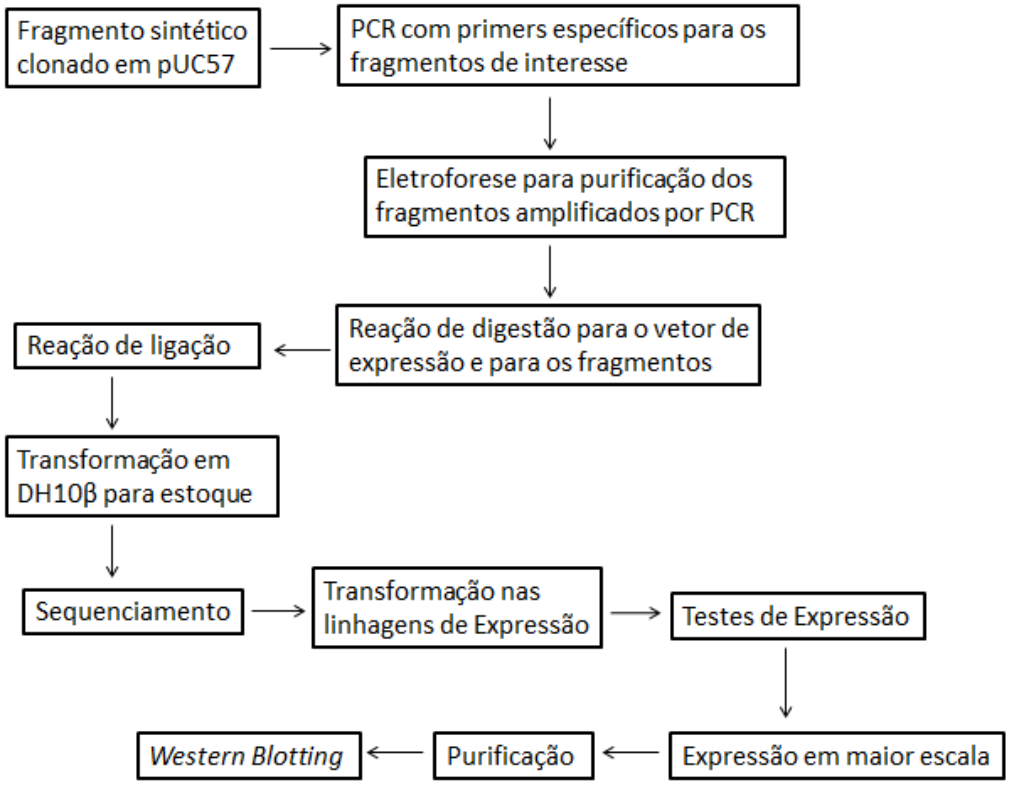
Este trabalho teve como objetivo a expressão das proteínas dos vírus dengue, zika e chikungunya, em células de *E. coli*

3.2 Objetivos Específicos/Metas

- Construção dos plasmídeos recombinantes de expressão pET28a-DENVNS1, pET28a-DENVE3, pET28a-ZIKVNS1, pET28a-CHIKVE2.
- Transformar células de *E. coli* com os vetores de expressão final
- Isolar os clones positivos
- Realizar testes de expressão
- Expressar a proteína recombinante em maior escala
- Purificar a proteína recombinante por cromatografia de afinidade, em coluna com resina contendo níquel
- Detectar a proteína recombinante via SDS-PAGE e *Western Blotting*

4. Materiais e Metodologia

4.1. Fluxograma



4.2. Construção do Plasmídeo Recombinante

As proteínas NS1 e a proteína EIII do sorotipo DEN-1 foram selecionadas para serem expressas. O uso da proteína EIII diminui a reatividade cruzada com o vírus Zika, uma vez que essa região da proteína do envelope (EIII) do DEN-1 possui somente 29% de homologia com o vírus Zika (STETTLER et al., 2016).

O fragmento sintetizado e clonado do vírus Zika é relativo à sequência da proteína NS1 que possui de 51-53% de homologia com a proteína NS1 do vírus Dengue.

Para o vírus Chikungunya o fragmento clonado foi do E2, responsável pela proteína do envelope do vírus.

As sequências que codificam para as proteínas NS1 e EIII do vírus Dengue, NS1 do vírus Zika e E2 do vírus Chikungunya, foram retiradas das análises dos bancos de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) depositadas sob os números de acesso KP188547.1, KP188547.1, KU497555.1, KP164571.1,

respectivamente. Estas sequências foram sintetizadas quimicamente pela empresa *GeneScript Corporation* (Piscataway, NJ, EUA) e clonadas no vetor pUC57.

Os vetores pUC57_DENVNS1, pUC57_DENVE3, pUC57_ZIKVNS1 e pUC57_CHIKVE2 foram utilizados como molde para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SAIKI *et al.,* 1988). Na PCR foram utilizados *primers* específicos, desenhados após análise das sequências do genoma dos diferentes vírus, com sítios de restrição devidamente adicionados. As enzimas de restrição foram escolhidas para a clonagem pela vantagem da permanência da cauda His-tag C-terminal e do sítio RBS não sendo, portanto, necessária a adição dos mesmos nos *primers.* Foram adicionados três nucleotídeos na extremidade 5´ de cada *primer* que serviram como facilitadores para a ancoragem das enzimas de restrição para a digestão do produto de PCR.

Tabela 1: *Primers* específicos

***Primers* Específicos**	**Sequências**	**Temperatura de anelamento(°C)**
DENVNS1 Fw	5’ AAACCATGGGGGACTCGGGATGTGTGATCAA 3’	54
DENVNS1 Rv	5’ TTTCTCGAGTGCAGAGACCATTGACCTAACT 3’	54
DENVE3 Fw	5’ AAACCATGGGGTATGTGATGTGCACAGGCTCAT 3’	53
DENVE3 Rv	5’ TTTCTCGAGCTTGAACCAGCTTAGTTTCAAAG 3’	53
ZIKVNS1 Fw	5’ AAACCATGGGGGGGTGCTCGGTGGACTTC 3’	53
ZIKVNS1 Rv	5’ TTTCTCGAGTGATCCTGCAGTCACCATTG 3’	53
CHIKVE2 Fw	5’AAACCATGGGGAGTATTAAGGACCACTTCAATGTC 3’	52
CHIKVE2 Rv	5’ TTTGTCGACCGCTTTAGCTGTTCTAATGCA 3’	52

Para a PCR foram utilizados 2,5 µL de tampão com MgSO4 10x (Thermo Scientific), 0,5 µL de dNTPs 10 mM (LUDWIG), 0,5 µL de *primer* Fw 10 pmol/ µL, 0,5 µL de *primer* Rv 10 pmol/ µL, 0,2 µL de Pfu DNA Polimerase recombinante (Thermo Scientific), 19,8 µL de água e 1 µL de DNA do vetor pUC57 recombinante com a sequência desejada (0,4 ng/ µL), totalizando um volume final de 25 µL. No ciclo utilizado, em termociclador (BIORAD), foi testado um gradiente de temperaturas de anelamento dos *primers*, que foi de 52 °C à 54 °C. Este ciclo foi 95 °C por 5 minutos, 92 °C por 45 segundos, 52-54 °C por 40 segundos, 72 °C por 45

segundos, repetidos 35 vezes, e 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR amplificados foram analisados em gel de agarose 0,5 % e purificados do gel utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA).

Os fragmentos de DNA purificadas foram quantificadas por métodos espectrofotométricos (SAMBROK *et al.* 1989) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) pH 8,0, juntamente com o marcador 1 kb. Após a migração, o gel foi levado ao transiluminador (SPECTROLINE) e visualizado em luz UV, para verificação da pureza da amostra e da integridade.

Os fragmentos correspondentes às sequências de interesse foram clivados pelas enzimas de restrição apropriadas (*NcoI e SalI* para a construção CHIKVE2 e *NcoI e XhoI* para as demais construções) com o objetivo de gerar extremidades coesivas que facilitam a reação de ligação ao vetor de expressão pET28a previamente linearizado pelas mesmas enzimas.

Tabela 2: Condições de reação de dupla digestão dos genes que codificam as proteínas CHIKVE2 e do vetor de expressão pET28a

Reagentes	**CHIKVE2**	**pET28a**
Tampão	Tango (12 µL)	Tango (10 µL)
DNA	45 µL (~540 ng)	8 µL (~1500 ng)
NcoI	1 µL (10 U/µL)	1 µL (10 U/µL)
SalI	2 µL (10 U/µL)	2 µL (10 U/µL)
Água	-	29 µL
Tempo de incubação	*Overnight*	*Overnight*
Tempo para inativação das enzimas	2 h	2 h
Volume final da reação	**60 µL**	**60 µL**

Fonte: dados da pesquisa

Tabela 3: Condições de reação de dupla digestão dos genes que codificam as proteínas DENVNS1, DENVE3 e ZIKVNS1 e do vetor de expressão pET28a.

Reagentes	DENVNS1	DENVE3	ZIKVNS1	pET28a
Tampão	Tampão FD (3 µL)	Tampão FD (3 µL)	Tampão FD (3 µL)	Tampão FD (3 µL)
DNA	15 µL (~1180 ng)	16 µL (~1200 ng)	15 µL (~1300 ng)	12 µL (~1690 ng)
NcoI (FD)	1,5 µL (10 U/µL)	1,5 µL (10 U/µL)	1,5 µL (10 U/µL)	1,5 µL (10 U/µL)
XhoI (FD)	1,5 µL (10 U/µL)	1,5 µL (10 U/µL)	1,5 µL (10 U/µL)	1,5 µL (10 U/µL)
Água	9 µL	8 µL	9 µL	12 µL
Tempo de incubação	30 min	30 min	30 min	30 min
Tempo para inativação das enzimas	20 min	20 min	20 min	20 min
Volume final da reação	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL

FD: *Fast Digest*
Fonte: dados da pesquisa

Todas as reações foram incubadas no termociclador T100 Thermal Cycle (Bio-Rad) à 37°C.

As amostras foram analisadas em gel de agarose 0,5 % e purificadas utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up* System (PROMEGA).

Em seguida, cada inserto foi ligado ao vetor de expressão respeitando a proporção de 3:1, ou seja, três moléculas de inserto para cada molécula de vetor.

De acordo com a seguinte fórmula:

$$(ng\ vetor\ x\ Kb\ tamanho\ inserto/Kb\ tamanho\ vetor)\ x\ 3/1 = ng\ de\ inserto$$

Tabela 4: Condições de reação de ligação dos insertos CHIKVE2, DENVNS1, ZIKVNS1 e DENVE3 ao vetor de expressão pET28a.

Reagentes	**CHIKVE2**	**DENVNS1**	**ZIKVNS1**	**DENVE3**
Água	9,4 µL	7,4 µL	7,4 µL	7,25 µL
Tampão Ligase (Biolabs)	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Inserto	3 µL (10 ng/µL)	3,6 µL (10 ng/µL)	3,6 µL (10 ng/µL)	1 µL (19 ng/µL)
Vetor pET28a	4,6 µL (15 ng/µL)	6 µL (10 ng/µL)	6 µL (10 ng/µL)	8,75 µL (10 ng/µL)
T4 DNA ligase (Biolabs)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Volume final da reação	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Fonte: dados da pesquisa

Todas as reações foram mantidas a 16 °C, *overnight,* no termociclador T100 Thermal Cycle (Bio-Rad).

Posteriormente, os conteúdos das reações de ligação foram utilizados na transformação de células competentes DH10β que se deu por choque térmico. Primeiramente, as células bacterianas competentes foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas em gelo por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 µL de DNA plasmidial e as células foram levadas ao banho-maria por 90 segundos a 42 °C e 2 minutos no gelo. Após o choque, foi adicionado 800 µL de LB caldo no tubo de células competentes e este permaneceu por 1 hora no banho a 37 °C. Utilizou-se 200 µL de células químio-competentes e 20 µL da reação de ligação. As bactérias foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB e canamicina (50µg/mL) - antibiótico para o qual o vetor é resistente e incubadas *overnight* na estufa 37 °C. As colônias selecionadas nas placas de LB sólido com antibiótico foram testadas quanto à presença dos plasmídeos recombinantes por reação de restrição com as enzimas adequadas ou através de PCR. As condições das reações foram as mesmas descritas anteriormente. Para as colônias positivas foram feitos estoques em glicerol 50% e armazenados à -80 °C.

4.3. Preparo de células de *E. coli* competentes

As cepas de bactérias utilizadas nesse trabalho foram tornadas competentes como descrito a seguir. As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido e

mantidas a 37º C, *overnight*. Uma colônia isolada dessa placa foi selecionada e expandida em 5 mL de meio LB líquido em tubo cônico de 50 mL e incubada a 37º C sob agitação a 200 rpm, *overnight*. No dia seguinte, 2 mL do pré-inóculo foi inoculado em 100 mL de meio LB líquido nas mesmas condições descritas anteriormente, até atingir densidade óptica (DO) de, aproximadamente, 0,4 a 600 nm (DO_{600}). Ao atingir essa DO, o volume total de inóculo foi dividido em tubos cônicos de 50 mL, estéreis, previamente acondicionados no gelo e centrifugados (4.000 *xg* a 4º C por 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspenso cuidadosamente em 35 mL de $CaCl_2$ 0,1 mM, gelado e estéril. Após repouso de 20 minutos, a suspensão de células foi novamente centrifugada (4.000 *xg* a 4º C por 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi cuidadosamente ressupenso em 8 mL de $CaCl_2$ 0,1 mM e 2 mL de glicerol 50%. A suspensão de células competentes foi fracionada em alíquotas de 200 µL que foram armazenadas a -80º C.

4.4. Sequenciamento nucleotídico da região codificadora da proteína recombinante de interesse

Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados via método de Sanger, método da terminação de cadeia utilizando dideoxiucleotídeos marcados com fluorocromos (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, Applied Biosystems, EUA). As reações de amplificação ocorreram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e o sequenciamento foi realizado em sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer 8-capillary (Applied Biosystems, EUA). Para o sequenciamento foram utilizados os *primers* T7 *Forward* e T7 *Reverse*. A reação foi realizada com aproximadamente 400 ng de DNA, tampão de sequenciamento (3 µL), BigDye Terminator 3.1 (2 µL), 4 µM de *primer* e água para um volume final de 20 µL. O eletroferograma obtido foi analisado com o auxílio do programa Bioedit Sequence Alignment Editor vc7.2.5 (HALL, 2013) para realizar o alinhamento das sequências e da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI) com a finalidade de comparar genes e proteínas com bancos de dados internacionais.

4.5. Transformação das construções em linhagens de *E. coli* *BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3) e Rosetta(DE3)*

O DNA recombinante foi extraído de células DH10β utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) de células DH10β do estoque. Para a transformação foram utilizadas células bacterianas competentes das linhagens BL21(DE3)pLySs, BL21(DE3) e Rosetta(DE3). A transformação das células se deu por choque térmico, conforme protocolo descrito anteriormente, e semeada em placas de Petri contendo meio LB Ágar e os antibióticos cloranfenicol (34 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL) no caso das linhagens BL21(DE3)pLySs e Rosetta(DE3) e apenas canamicina (50 µg/mL) para a linhagem BL21(DE3). As placas foram deixadas *overnight* na estufa a 37 °C.

4.6. Expressão em BL21(DE3) e BL21(DE3)pLySs

Nos primeiros ensaios de expressão das proteínas recombinantes foram utilizadas as linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)pLySs. Para a ativação da expressão foram testadas diferentes concentrações de IPTG (sem IPTG, 0,1 mM, 0,5 mM e 1,0 mM) em diferentes temperaturas (37º C, 30º C e 25º C) por diferentes tempos de indução (30 minutos, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e *overnight*).

Inicialmente, os clones de bactérias de expressão contendo o vetor recombinante foram inoculados em 10 mL de meio LB caldo com o antibiótico específico e incubados à 37º C sob agitação a 200 rpm, overnight. No dia seguinte, 10 mL desse pré inóculo foi adicionado a 250 mL de meio LB caldo com antibiótico em *erlenmeyer* de 1L, estéril e deixado sob agitação constante a 200 rpm, na temperatura a ser avaliada (25º C, 30º C, 37º C). A DO foi medida a 600 nm e, quando atingiu um valor no intervalo de 0,4 a 0,6, uma alíquota de 1 mL da cultura (tempo zero) foi transferida para tubo de 1,5 mL e centrifugada a 16.000 *xg* por 2 minutos a 4º C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* armazenado a -20º C. Após a retirada dessa primeira alíquota, foi adicionado à cultura de bactérias IPTG para uma concentração final de 1 mM para induzir a expressão da proteína recombinante. Foram retiradas alíquotas de 1 mL em diferentes tempos (30 minutos, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e *overnight* após a adição de IPTG) que também foram centrifugadas nas mesmas condições.

Para avaliar a solubilidade da proteína recombinante, os *pellets* recolhidos das amostras nos diferentes tempos de indução foram ressuspensos em 100 µL de

tampão de lise, homogeneizados e sonicados. A sonicação ocorreu em quatro pulsos de 10 segundos de duração e 50 de amplitude, com intervalo de 10 segundos entre eles. As amostras foram centrifugadas a 16.000 *xg* por 10 minutos a 4º C e os sobrenadantes (fração de proteínas solúveis) foram separados dos *pellets* (fração de proteínas insolúveis), sendo que este último foi ressuspenso em 50 µL de tampão de lise. Ambos foram devidamente identificados e armazenados a -20º C.

Para identificação da expressão da proteína recombinante e da fração onde ela se encontra, as frações solúveis e insolúveis foram ressuspensas em tampão de amostra (β-mercaptoetanol 2,0%, Tris-HCl pH 6,8 62,5 mmol/L, glicerol 10 %, SDS 2,0%, azul de bromofenol 0,1%) e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

Em ensaios posteriores, os plasmídeos de expressão recombinantes foram usados para transformar a linhagem Rosetta(DE3). Os testes de expressão, descritos a seguir, foram realizados para avaliar as melhores condições para produção das proteínas.

4.7 Testes de expressão em Rosetta(DE3)

Os testes de expressão foram realizados utilizando a linhagem Rosetta(DE3) transformada com o vetor recombinante e foram avaliadas diferentes concentrações de IPTG (0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM) e tempos de indução (4 h e 8 h).

Uma colônia recombinante foi inoculada em 5 mL de caldo LB acrescido dos antibióticos adequados para a linhagem, cloranfenicol (34µg/mL) e canamicina (50µg/mL). Esse pré-inóculo foi mantido sob agitação constante de 200 rpm a 37°C, *overnight*. Após esse período, 1 mL do pré-inóculo crescido foi adicionado a 250 mL de caldo LB acrescido dos mesmos antibióticos e mantido em agitação à 37º C até atingir DO_{600}. Em tubos cônicos de 50 mL foram colocados 10 mL para que as condições fossem avaliadas e adicionou-se IPTG de acordo com a concentração a ser testada em cada tubo.

Decorrido o tempo de indução para cada condição, as amostras foram centrifugadas a 4000*xg* por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 600 µL de Tampão de Lise (Tris 10 mM, NaH_2PO_4 60 mM e NaCl 100 mM). Em seguida, a amostra foi sonicada com quatro pulsos de 10 segundos de duração e 50 de amplitude, intercalados com 10 segundos de

descanso em gelo. As amostras foram centrifugadas a 4000 *xg* por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante (fração de proteínas solúveis) foi separado do *pellet* (fração de proteínas insolúveis). O *pellet* foi ressuspendido em 600 µL de solução de ureia 8 M e, em seguida, as frações solúvel e insolúvel foram analisadas.

4.8 Expressão das proteínas recombinantes em maior escala

A expressão em maior escala de cada uma das proteínas de interesse foi realizada na melhor condição de expressão encontrada nos testes de expressão a fim de maximizar o rendimento. O pré-inóculo (1 mL) foi adicionado a 250 mL de meio LB caldo acrescido de antibiótico adequado e incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir DO_{600} de aproximadamente 0,4. Ao atingir a absorbância desejada, adicionou-se IPTG nas concentrações escolhidas de acordo com os testes de expressão.

Decorrido o tempo de indução estabelecido, o inóculo foi centrifugado a 4000 x*g* por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e a fração insolúvel foi ressupendida em 25 mL de tampão de lise, sonicada nas mesmas condições descritas anteriormente e centrifugada a 4000 *xg* por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressupendido em tampão de ressuspensão (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, 0,5% Triton X100, pH 8,0) e submetido a centrifugação a 8000 *xg*, 10°C por 15 minutos, esse passo foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, o *pellet* resultante do passo anterior foi ressupendido em tampão de lavagem (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, pH 8,0) a fim de retirar o Triton da amostra e submetido a centrifugação nas mesmas condições anteriores. Esse passo foi repetido por mais duas vezes. O *pellet* formado no passo anterior foi ressuspendido em tampão de desnaturação (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, Ureia 8 M, pH 8,0) e incubado sob leve agitação, em geladeira, *overnight*. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 10.000 *xg*, 10°C por 30 minutos e o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45 µm (Millipore).

4.9 Purificação

As proteínas recombinantes foram produzidas associadas a uma cauda de histidina para auxiliar nos processos de purificação. As amostras contendo as proteínas desnaturadas foram submetidas à purificação por cromatografia de afinidade ao níquel em condições desnaturantes, utilizando colunas de Níquel Sepharose High Performance HisTrap de 1 mL (GE Helthcare), na qual as proteínas se aderem pela cauda de histidina por afinidade química. O equipamento utilizado para a purificação foi um FPLC AKTA (GE Healthcare).

Primeiramente, a coluna foi equilibrada utilizando cerca de 5 mL do tampão de desnaturação e, para realização da corrida, cerca de 2 mL das amostras foram aplicados na coluna. A lavagem da coluna foi realizada utilizando 10 mL de tampão de desnaturação modificado (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, Imidazol 30 mM, pH 8,0). Em seguida, as proteínas foram eluídas utilizando o tampão de eluição (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, Ureia 8 M, Imidazol 500 mM, pH 8,0), em concentrações crescentes de imidazol aplicando um gradiente linear (de 0 a 100%) de forma que o imidazol ao competir com as histidinas pelo níquel, permite a liberação da proteína recombinante de forma purificada. Frações de 1 mL foram coletadas e esta etapa de purificação foi analisada em SDS-PAGE 12%.

4.10 Quantificação de proteínas

A quantidade estimada de proteínas presentes nas amostras coletadas na etapa de purificação foi determinada pelo método de Bradford. Este método baseia-se na observação da existência do *Coomassie Brilliant Blue G-250* em duas cores diferentes, vermelho e azul. A forma vermelha é convertida para a forma azul após a ligação do corante à proteína. É um método rápido e de fácil execução, que apresenta grande sensibilidade e sofre pouca interferência de outros reagentes (BRADFORD, 1976).

O reagente de Bradford foi preparado pela diluição de 100 mg do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* em 50 mL de etanol, 100 mL de ácido fosfórico 85% (m/v), água *qsp* 1 L e armazenada a 4ºC.

Para a determinação foram adicionados 20 µL de cada amostra em 1 mL do reagente de Bradford. As amostras utilizadas foram as frações referentes ao pico

gerado no processo de purificação, a fração que não se ligou à coluna e a amostra que não passou pelo processo de purificação. As amostras reagiram por 5 minutos em ambiente escuro e a absorbância da reação foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. A concentração das proteínas foi determinada através da interpolação de dados de uma curva de calibração previamente preparada e baseada em soro de albumina bovina como padrão.

4.11 Detecção das proteínas recombinantes por *Western Blotting*

A detecção das proteínas recombinantes DENVNS1, ZIKVNS1 e DENVE3 foi realizada por *Western Blotting* com anticorpo anti His-tag (GE Healthcare).

As amostras referentes ao pico obtido na purificação de cada uma das proteínas foram separadas em um gel SDS-PAGE 12%, sendo elas: a fração 8 das proteínas DENVNS1, ZIKVNS1 e DENVE3, além do marcador *Precision Plus Protein Satndarts Kaleidoscope* (Bio-Rad). A transferência foi realizada em sistema de eletrotransferência *Mini Trans-Blot Eletrophoretic transfer Cell System* (Bio-Rad) contendo tampão de transferência nos seguintes parâmetros: 150 mA por 2 horas.

Para avaliar a eficiência da transferência, a membrana foi corada com Solução de Ponceau (250 µL de Ponceau, 50 µL de ácido acético e 50 mL de água) por 5 minutos. O corante foi removido com água destilada e a membrana foi incubada em solução de bloqueio (2,5 g de leite desnatado em 50 mL de TBS) por 1 hora sob agitação suave e temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi submetida a três lavagens consecutivas, sob agitação, com TBS (Tris 2,42 g, NaCl 8,0 g e 1000 mL de água, pH 7,6), de 5 minutos cada. A membrana foi incubada com o anticorpo primário Anti-His (GE Healthcare) *overnight*, sob leve agitação em geladeira, na diluição de 1:8000. A membrana foi lavada da mesma forma descrita anteriormente. Em seguida, incubou-se a membrana com o anticorpo secundário anti-mouse (Sigma), na diluição de 1: 10000 por 1 hora e 30 minutos e depois outro processo de lavagem. Após as lavagens, a membrana foi incubada por 30 segundos em 5 mL de solução reveladora *"ECL Western Blotting system"* com 2µL de H_2O_2 e a imagem foi revelada e capturada em fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

4.12 Detecção da proteína recombinante DENVNS1 por Teste imunocromatográfico rápido

Muitos testes rápidos baseiam-se no princípio da imunocromatografia de fluxo lateral.

O Imuno-RÁPIDO Dengue NS1 da WAMA diagnóstica® é um teste destinado à detecção qualitativa da presença do antígeno NS1 no sangue total, soro ou plasma humano. O dispositivo de teste apresenta em sua superfície as letras “T” e “C”, indicando respectivamente a linha teste e a linha controle, sendo que estas não são visíveis antes da aplicação da amostra.

O antígeno NS1 presente nas amostras de soro, plasma ou sangue total liga-se ao conjugado anti-NS1 marcado com ouro coloidal e o imuno-complexo formado migra por capilaridade pela membrana do teste (previamente sensibilizada) e, ao passar pela linha teste (T), liga-se aos anticorpos monoclonais anti-NS1 presentes nesta região, ocasionando o surgimento de uma linha colorida nesta área. Na ausência do antígeno NS1, não há o aparecimento da faixa colorida na área teste. A linha controle (C) é utilizada para controle do procedimento e deve sempre aparecer colorida, indicando a correta execução do teste e funcionamento dos reagentes.

A amostra a ser avaliada foi combinada com soro bovino fetal (Sigma) (60 µL de amostra e 100 µL do soro bovino fetal) e aplicada no teste.

Os kits utilizados foram cedidos pela WAMA diagnóstica®.

5 Resultados e Discussão

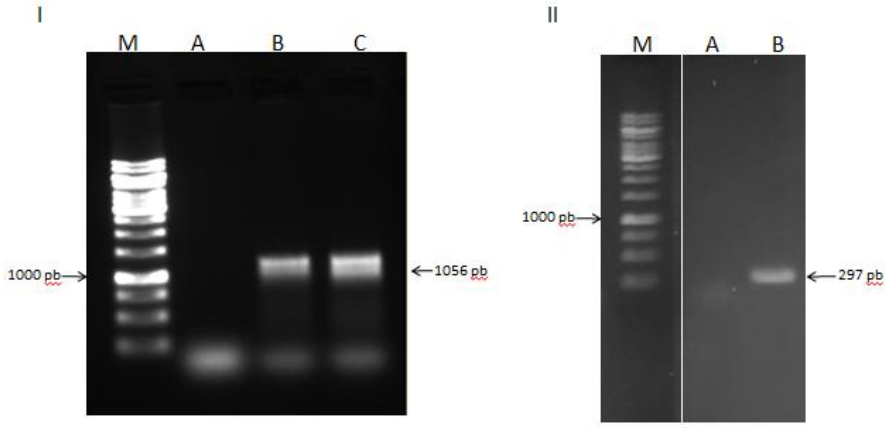
5.7 Clonagem dos fragmentos codificantes das proteínas DENVNS1, DENVE3, ZIKVNS1 e CHIKVE2 em vetor pET28a

Anteriormente à clonagem dos fragmentos de interesse foram realizadas reações de PCR com *primers* e DNA moldes específicos.

As amplificações dos fragmentos do vírus da dengue foram realizadas a partir dos vetores pUC57_DENVNS1 e pUC57_DENVE3. Foram empregadas duas concentrações de DNA molde (0,4 ng/µL e 4 ng/µL). A Figura 5 - I mostra a visualização da amplificação do gene referente a DENVNS1. Observa-se nas linhas B e C que houve amplificação de um fragmento com o tamanho esperado de aproximadamente 1060 pb. Na Figura 5 -II pode ser vista a amplificação do fragmento DENVE3 com o tamanho esperado de cerca 300 pb na linha A do gel a partir do vetor pUC57_DENVE3.

As condições iniciais da reação utilizadas foram adequadas para a amplificação. As reações de PCR de cada sequência foram reunidas e os DNA purificados do gel para posterior clonagem.

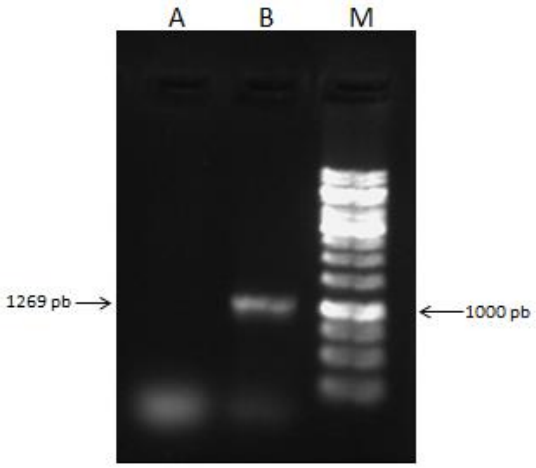
Figura 7: Amplificação das sequências DENVNS1 e DENVE3. I - Gel de Agarose 1% corado com Gel Red mostrando amplificação de DENVNS1 (1056 pb) por PCR realizada empregando-se pUC57_DENVNS1 como DNA molde. M: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Thermo Scientific); A: controle negativo da reação de PCR; B: Fragmento amplificado a partir DNA molde 0,4 ng/µL; C: Amplificação a partir de DNA molde 4 ng/µL. II- Gel de Agarose 1% corado com Gel Red mostrando a amplificação da sequências DENVE3 por PCR a partir de pUC57_DENVE3. M: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Thermo Scientific);A: controle negativo; B: Sequência de DENVE3 (297 pb) amplificada; M: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Thermo Scientific).



Fonte: Imagem do autor

O fragmento de Chikungunya foi amplificado a partir do vetor pUC57_CHIKVE2. A Figura 6 mostra a amplificação do gene CHIKVE2. Observa-se na linha B a amplificação de fragmento com o tamanho esperado de aproximadamente 1300 pb. Desta forma, o fragmento do gene foi purificado do gel para prosseguimento dos passos de clonagem.

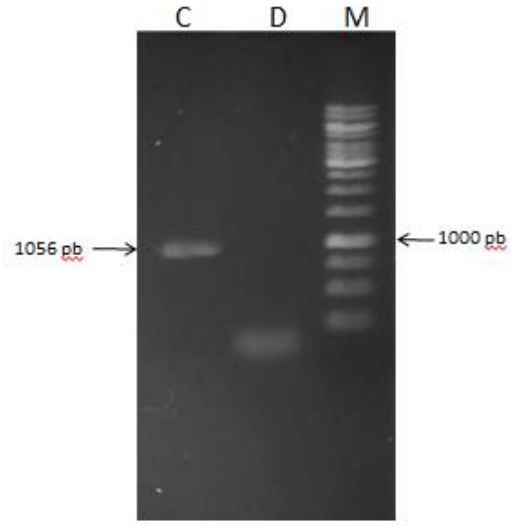
Figura 8: Amplificação da sequência CHIKVE2. Gel de Agarose 1% corado com Gel Red mostrando a amplificação da CHIKVE2 a partir de pUC57_CHIKVE2. M: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Thermo Scientific); A: controle negativo da PCR; B: Fragmento amplificado de CHIKVE2 com aproximadamente 1300 pb.



Fonte: Imagem do autor

A amplificação do gene referente ZIKVNS1 por PCR gerou um fragmento com o tamanho esperado de aproximadamente 1056pb. Na figura 7 está apresentado a amplificação do fragmento ZIKVNS1 na linha C que foi gerado usando o DNA do vetor pUC57_ZIKVNS1 como molde.

Figura 9: Amplificação da sequência ZIKVNS1. Gel de Agarose 1% corado com Gel Red mostrando a amplificação por PCR da sequência ZIKVNS1 a partir de pUC_ZIKVNS1 C: Sequência de ZIKVNS1 (1056 pb) amplificada. D: controle negativo ; M: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Thermo Scientific).



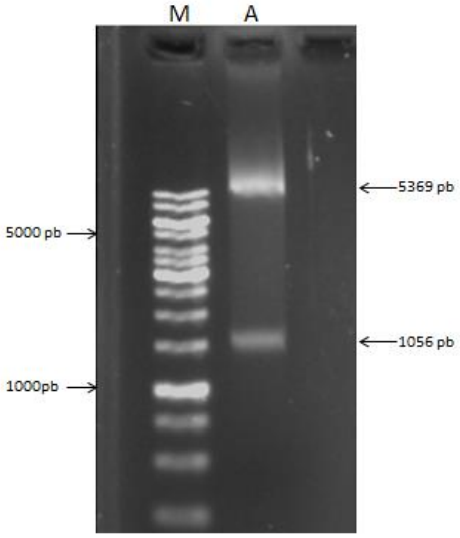
Fonte: imagem do autor

O vetor de expressão pET28a foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas (dados não mostrados) para posterior ligação aos fragmentos gerados por PCR das sequências de interesse no trabalho. A reação de ligação foi feita com enzima ligase.

Após a reação de ligação, os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH10β. A reação de ligação foi semeada em LB Agar contendo ampicilina. A presença do vetor recombinante contendo cada um dos genes de interesse foi confirmada por PCR de colônia ou por teste de restrição após extração dos plasmídeos das bactérias recombinantes.

Para o plasmídeo recombinante **pET28a_ZIKVNS1**, as colônias foram analisadas por teste de restrição com as enzimas NcoI e XhoI (Figura 10). Na imagem, é possível observar o aparecimento de dois fragmentos de tamanhos diferentes, um que corresponde ao vetor de expressão, de aproximadamente 5300 pb, e outro que corresponde ao fragmento do gene, de aproximadamente 1000 pb, confirmando assim, a clonagem deste fragmento no vetor de expressão.

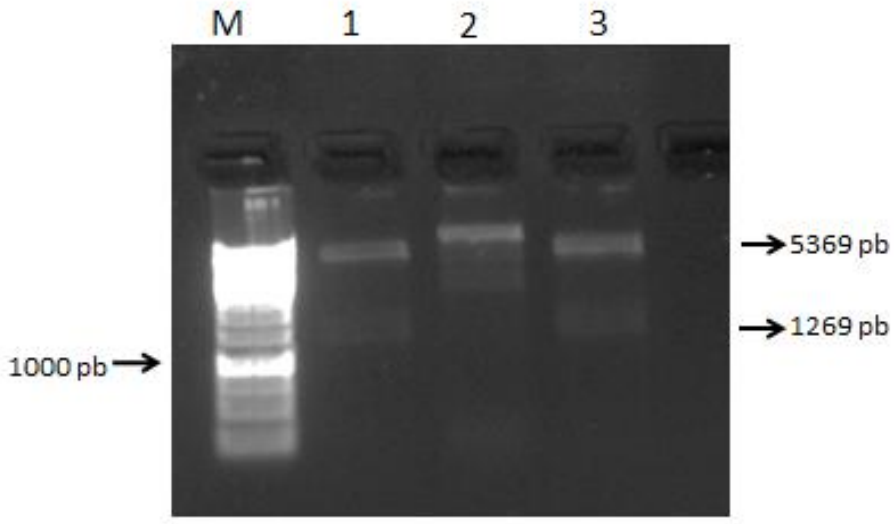
Figura 10: Digestão do plasmídeo recombinante pET28a_ZIKVNS1. Gel de agarose 1%, resultado da digestão do plasmídeo recombinante pET28_ZIKVNS1 com as enzimas XhoI e NcoI; M: marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb (Thermo Scientific)*; A: Presença do fragmento referente ao pET28a (aproximadamente 5300 pb) e a sequência ZIKVNS1 (aproximadamente 1060 pb).



Fonte: Imagem do autor

Para o plasmídeo recombinante **pET28a_CHIKVE2** a análise por restrição foi realizada com as enzimas NcoI e SalI (Figura 11). Observa-se que após digestão com as enzimas, os plasmídeos extraídos das colônias 1 e 3 apresentaram dois fragmentos no gel de agarose, um que corresponde ao vetor de expressão e outro que corresponde ao fragmento CHIKVE2, de aproximadamente 1270 pb. A colônia 2 foi negativa para restrição do vetor.

Figura 11: Digestão do plasmídeo recombinante pET28a_CHIKVE2. Gel de agarose 1%, resultado da digestão do plasmídeo recombinante pET28a_CHIKVE2, com as enzimas NcoI e SalI; é possível visualizar a presença de DNA plasmidial (pET28a, 5369 pb) e da sequência de CHIKVE2 (1270 pb). M: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Thermo Scientific); 1: Clone recombinante positivo; 2: Clone negativo; 3: Clone recombinante positivo.

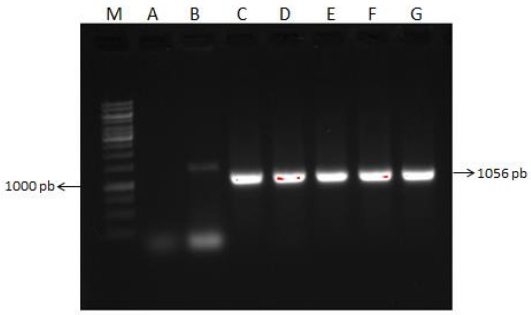


Fonte: Imagem do autor

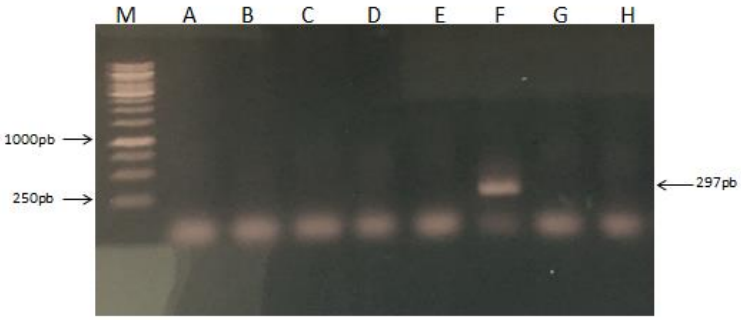
Para confirmação dos clones positivos para os plasmídeos construídos com as sequências gênicas do vírus da dengue (**pET28a-DENVNS1 e pET28a_DENVE3)**, foram realizadas PCR das colônias geradas utilizando *primers* específicos. Após a corrida em gel de agarose, foi possível observar que houve amplificação de DNA correspondente ao tamanho dos insertos. A análise das colônias recombinantes com **pET28a-DENVNS1** mostrou que 5 colônias foram transformadas com o vetor recombinantes entre 6 testadas, enquanto que de nove colônias recombinantes de **pET28a_DENVE3** uma teve amplificação da sequência do fragmento.

Figura 12: Identificação de clones recombinantes de DENVNS1 e DENVE3 em pET28a. Fotografia de um gel de agarose 1%, resultado da PCR de colônias. **I- DENVNS1:** M: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Thermo Scientific); A: Controle negativo da PCR; B: colônia negativa para o inserto com o inserto não inserido corretamente; C,D,E,F e G: colônias recombinantes. **II – DENV3:** M: marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb Ladder (Thermo Scientific)*; A: Controle negativo; B, C, D, E, G e H: colônias sem amplificação do inserto, F: Fragmento amplificado de colônia recombinante.

I – DENVNS1



II- DENVE3



Fonte: Imagem do autor

5.2 Análise do Sequenciamento

Os vetores recombinantes foram sequenciados, para a confirmação da sequência e para verificação se houve introdução dos fragmentos nos vetores em correta fase aberta de leitura, via método de Sanger. Nas figuras seguintes estão apresentadas as sequências geradas pelo sequenciamento e estão realçadas as regiões de início e fim da sequência, sítio de restrição das enzimas e cauda de histidina.

Figura 13: Sequenciamento do fragmento codificante para a proteína DENVNS1 recombinante. Os traços vermelhos indicam os sítios das enzimas de restrição. A caixa azul indica a cauda de histidina. A seta rosa indica o inicio da sequência da proteína madura e o asterisco mostra o *stop* códon.

```
DENVNS1   1    CCATGGGGGACTCGGGATGTGTGATCAACTGGAAGGGCAGAGAACTCAAATGTGGAAGTG
                  M  G  D  S  G  C  V  I  N  W  K  G  R  E  L  K  C  G  S

DENVNS1   61   GCATCTTTGTCACTAATGAAGTCCACACTTGGACAGAGCAATATAAATTCCAGGCTGACT
               G  I  F  V  T  N  E  V  H  T  W  T  E  Q  Y  K  F  Q  A  D

DENVNS1   121  CCCCAAAAAGACTGTCAGCAGCCATTGGGAAGGCATGGGAGGAAGGCGTGTGTGGAATTC
               S  P  K  R  L  S  A  A  I  G  K  A  W  E  E  G  V  C  G  I

DENVNS1   181  GATCAGCCACGCGTCTTGAGAACATCATGTGGAAGCAAATATCAAATGAATTGAACTACA
               R  S  A  T  R  L  E  N  I  M  W  K  Q  I  S  N  E  L  N  Y

DENVNS1   241  TCCTACTTGAAAATGACATGAAATTCACAGTGGTTGTGGGAGACGTTAATGGAATTTTGG
               I  L  L  E  N  D  M  K  F  T  V  V  V  G  D  V  N  G  I  L

DENVNS1   301  CCCAAGGAAAAAAAATGATTAAACCACAACCTATGGAACACAAATACTCATGGAAAAGTT
               A  Q  G  K  K  M  I  K  P  Q  P  M  E  H  K  Y  S  W  K  S

DENVNS1   361  GGGGAAAAGCCAAGATCATAGGAGCAGACATACAGAACACCACCTTTATCATTGACGGCC
               W  G  K  A  K  I  I  G  A  D  I  Q  N  T  T  F  I  I  D  G

DENVNS1   421  CAGATACTCCAGAATGCCCCGATGACCAAAGAGCATGGAACATTTGGGAAGTTGAGGACT
               P  D  T  P  E  C  P  D  D  Q  R  A  W  N  I  W  E  V  E  D

DENVNS1   481  ACGGGTTCGGAATTTTCACGACAAACATATGGCTGAAATTGCGTGACTCCCACACCCAAA
               Y  G  F  G  I  F  T  T  N  I  W  L  K  L  R  D  S  H  T  Q

DENVNS1   541  TGTGTGACCATCGGCTAATGTCAGCTGCCATCAAGGACAGCAAAGCAGTCCATGCTGATA
               M  C  D  H  R  L  M  S  A  A  I  K  D  S  K  A  V  H  A  D

DENVNS1   601  TGGGGTACTGGATAGAAAGTGAAAAGAACGAGACCTGGAAGCTAGCGAGAGCCTCCTTTA
               M  G  Y  W  I  E  S  E  K  N  E  T  W  K  L  A  R  A  S  F

DENVNS1   661  TAGAAGTCAAGACATGCATCTGGCCGAAATCCCACACTCTATGGAGTAATGGAGTTTTGG
               I  E  V  K  T  C  I  W  P  K  S  H  T  L  W  S  N  G  V  L
```

```
DENVNS1   721  AAAGTGAAATGGTAATCCCAAAGATATATGGAGGACCAATATCTCAGCACAACTACAGAC
               E  S  E  M  V  I  P  K  I  Y  G  G  P  I  S  Q  H  N  Y  R

DENVNS1   781  CAGGGTATTTCACACAAACAGCAGGGCCCTGGCACCTAGGCAAGTTGGAATTGGATTTTG
               P  G  Y  F  T  Q  T  A  G  P  W  H  L  G  K  L  E  L  D  F

DENVNS1   841  ACTTGTGTGAAGGTACCACAGTTGTTGTAGATGAACATTGTGGATATCGAGGCCCATCCC
               D  L  C  E  G  T  T  V  V  V  D  E  H  C  G  Y  R  G  P  S

DENVNS1   901  TCAGAACTACAACAGTTACAGGAAAGATAATCCATGAATGGTGTTGCAGATCCTGCACGT
               L  R  T  T  T  V  T  G  K  I  I  H  E  W  C  C  R  S  C  T

DENVNS1   961  TACCCCCCTTACGCTTCAGAGGAGAAGACGGATGTTGGTATGGCATGGAAATCAGACCAG
               L  P  P  L  R  F  R  G  E  D  G  C  W  Y  G  M  E  I  R  P

DENVNS1   1021 TTAAGGAGAAGGAGGAGAACCTAGTTAGGTCAATGGTCTCTGCACTCGAGCACCACCACC
               V  K  E  K  E  E  N  L  V  R  S  M  V  S  A  L  E  H  H  H

DENVNS1   1081 ACCACCACTGA
               H  H  H  *
```

Figura 14: Sequenciamento do gene da proteína DENVE3 recombinante. Os traços vermelhos indicam os sítios das enzimas de restrição. A caixa azul indica a cauda de histidina. A seta rosa indica o inicio da sequência da proteína madura e o asterisco mostra o *stop* códon.

```
DENVE3   1    CCATGGGGTATGTGATGTGCACAGGCTCATTTAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCC
                 M  G  Y  V  M  C  T  G  S  F  K  L  E  K  E  V  A  E  T

DENVE3   61   AGCATGGAACTGTTTTAGTGCAGGTTAAATACGAAGGAACAGACGCACCATGCAAGATCC
              Q  H  G  T  V  L  V  Q  V  K  Y  E  G  T  D  A  P  C  K  I

DENVE3   121  CTTTTCTGACCCAAGATGAAAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCTAATC
              P  F  L  T  Q  D  E  K  G  V  T  Q  N  G  R  L  I  T  A  N

DENVE3   181  CTATAGTTACTGATAAAGAAAAACCAGTCAACATTGAGACAGAACCACCTTTTGGTGAGA
              P  I  V  T  D  K  E  K  P  V  N  I  E  T  E  P  P  F  G  E

DENVE3   241  GCTACATCGTGGTAGGGGCAGGTGAAAAAGCTTTGAAACTAAGCTGGTTCAAGCTCGAGC
              S  Y  I  V  V  G  A  G  E  K  A  L  K  L  S  W  F  K  L  E

DENVE3   301  ACCACCACCACCACCACTGA
              H  H  H  H  H  H  *
```

Figura 15: Sequenciamento do gene da proteína ZIKVNS1 recombinante. Os traços vermelhos indicam os sítios das enzimas de restrição. A caixa azul indica a cauda de histidina. A seta rosa indica o inicio da sequência da proteína madura e o asterisco mostra o *stop* códon.

```
ZIKVNS1   1    CCATGGGGGGGTGCTCGGTGGACTTCTCAAAGAAGGAGACGAGATGTGGTACAGGGGTGT
                  M  G  G  C  S  V  D  F  S  K  K  E  T  R  C  G  T  G  V

ZIKVNS1   61   TCGTCTATAACGACGTTGAAGCCTGGAGGGACAGGTACAAGTACCATCCTGACTCTCCCC
               F  V  Y  N  D  V  E  A  W  R  D  R  Y  K  Y  H  P  D  S  P

ZIKVNS1   121  GTAGATTGGCAGCAGCAGTCAAGCAAGCCTGGGAAGATGGTATCTGCGGGATCTCCTCTG
               R  R  L  A  A  A  V  K  Q  A  W  E  D  G  I  C  G  I  S  S

ZIKVNS1   181  TTTCAAGAATGGAAAACATCATGTGGAGATCAGTAGAAGGGGAGCTTAACGCAATCCTGG
               V  S  R  M  E  N  I  M  W  R  S  V  E  G  E  L  N  A  I  L

ZIKVNS1   241  AAGAGAATGGAGTTCAACTGACGGTCGTTGTGGGATCTGTAAAAAACCCCATGTGGAGAG
               E  E  N  G  V  Q  L  T  V  V  V  G  S  V  K  N  P  M  W  R

ZIKVNS1   301  GTCCACAGAGATTGCCCGTGCCTGTGAACGAGCTGCCCCACGGCTGGAAGGCTTGGGGGA
               G  P  Q  R  L  P  V  P  V  N  E  L  P  H  G  W  K  A  W  G

ZIKVNS1   361  AATCGTACTTCGTCAGAGCAGCAAAGACAAATAACAGCTTTGTCGTGGATGGTGACACAC
               K  S  Y  F  V  R  A  A  K  T  N  N  S  F  V  V  D  G  D  T

ZIKVNS1   421  TGAAGGAATGCCCACTCAAACATAGAGCATGGAACAGCTTTCTTGTGGAGGATCATGGGT
               L  K  E  C  P  L  K  H  R  A  W  N  S  F  L  V  E  D  H  G

ZIKVNS1   481  TCGGGGTATTTCACACTAGTGTCTGGCTCAAGGTTAGAGAAGATTATTCATTAGAGTGTG
               F  G  V  F  H  T  S  V  W  L  K  V  R  E  D  Y  S  L  E  C

ZIKVNS1   541  ATCCAGCCGTTATTGGAACAGCTGTTAAGGGAAAGGAGGCTGTACACAGTGATCTAGGCT
               D  P  A  V  I  G  T  A  V  K  G  K  E  A  V  H  S  D  L  G

ZIKVNS1   601  ACTGGATTGAGAGTGAGAAGAATGACACATGGAGGCTGAAGAGGGCCCATCTGATCGAGA
               Y  W  I  E  S  E  K  N  D  T  W  R  L  K  R  A  H  L  I  E

ZIKVNS1   661  TGAAAACATGTGAATGGCCAAAGTCCCACACATTGTGGACAGATGGAATAGAAGAGAGTG
               M  K  T  C  E  W  P  K  S  H  T  L  W  T  D  G  I  E  E  S
```

```
ZIKVNS1   721  ATCTGATCATACCCAAGTCTTTAGCTGGGCCACTCAGCCATCACAATACCAGAGAGGGCT
               D  L  I  I  P  K  S  L  A  G  P  L  S  H  H  N  T  R  E  G

ZIKVNS1   781  ACAGGACCCAAATGAAAGGGCCTTGGCACAGTGAAGAGCTTGAAATTCGGTTTGAGGAAT
               Y  R  T  Q  M  K  G  P  W  H  S  E  E  L  E  I  R  F  E  E

ZIKVNS1   841  GCCCAGGCACTAAGGTCCACGTGGAGGAAACATGTGGAACAAGAGGACCATCTCTGAGAT
               C  P  G  T  K  V  H  V  E  E  T  C  G  T  R  G  P  S  L  R

ZIKVNS1   901  CAACCACTGCAAGCGGAAGGGTGATCGAGGAATGGTGCTGCAGGGAGTGCACAATGCCCC
               S  T  T  A  S  G  R  V  I  E  E  W  C  C  R  E  C  T  M  P

ZIKVNS1   961  CACTGTCGTTCCGGGCTAAAGATGGCTGTTGGTATGGAATGGAGATAAGGCCCAGGAAAG
               P  L  S  F  R  A  K  D  G  C  W  Y  G  M  E  I  R  P  R  K

ZIKVNS1   1021 AACCAGAAAGCAACTTAGTAAGGTCAATGGTGACTGCAGGATCACTCGAGCACCACCACC
               E  P  E  S  N  L  V  R  S  M  V  T  A  G  S  L  E  H  H  H

ZIKVNS1   1081 ACCACCACTGA
               H  H  H  *
```

Analisando os dados dos sequenciamentos foi confirmada a clonagem correta dos genes codificantes para as proteínas DENVNS1, ZIKVNS1, DENVE3 (Figuras 13, 14 e 15) no plasmídeo de expressão pET28a. Nenhuma mutação foi inserida nas sequências e não houve saída de fase de leitura.

O gene da proteína CHIKVE2 também foi clonado e não houve saída de fase de leitura. Porém, não foi possível obter alguns trechos do sequenciamento e, consequentemente, não foi possível observar se ocorreram mutações (dados não apresentados).

5.3 Expressão das proteínas recombinantes

A expressão das proteínas recombinantes foi conduzida em diferentes linhagens de *E. coli* e em diferentes condições de indução, como concentração do indutor, temperatura de incubação e tempo de indução. Essas condições devem ser

testadas e otimizadas, pois podem variar dependendo da proteína de interesse entre outros fatores que são específicos de cada processo.

Os experimentos de indução da expressão proteica foram realizados primeiramente em linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)pLySs (dados não mostrados). Foram obtidos níveis expressão baixos ou mesmo ausência da produção das proteínas recombinantes de interesse nessas linhagens. Esse achado motivou um estudo da quantidade de códons raros para *E. coli* presentes nos genes que codificam para essas proteínas.

Muitas vezes a expressão de genes recombinantes em *E. coli* não ocorre ou está consideravelmente diminuída devido a uma diferença entre os códons presentes no gene de interesse e os códons preferencialmente usados pela *E. coli* hospedeira. A presença de códons raros limita a expressão da proteína recombinante pela baixa quantidade de tRNA para esses códons nas bactérias hospedeiras, podendo ocasionar o término da tradução de forma prematura ou falha na incorporação correta dos aminoácidos durante a tradução (KANE, 1995; KURLAND; GALLANTT, 1996). Nessa situação de desequilíbrio há níveis reduzidos de tradução que resultam em baixos níveis de expressão da proteína recombinante. Os principais códons raros para *E. coli* são os que codificam para os aminoácidos arginina (AGA e AGG), leucina (CUA), isoleucina (AUA), prolina (CCC) e glicina (GGA) (GOPAL; KUMAR, 2013).

Nas tabelas presentes nos anexos está mostrada a porcentagem de códons raros que codificam para determinado aminoácido em relação à quantidade de códons totais que codificam o mesmo aminoácido e que estão presentes no gene de cada uma das proteínas deste trabalho. Os primeiros códons raros a serem relatados na literatura por terem efeitos prejudiciais na expressão de proteínas foram AGG e AGA, que codificam para o aminoácido arginina e ocorrem em *E. coli* na frequência de 0,14% e 0,21%, respectivamente (KANE, 1995).

Na tabela 5 é mostrada a porcentagem de códons raros encontrados para cada sequência em relação à quantidade de códons totais presentes no gene específico.

Tabela 5: Distribuição dos Códons Raros nas sequências de DENVE3, DENVNS1, CHIKVE2 e ZIKNS1. Porcentagens calculadas em relação ao número total de códons de cada sequência.

	Número total de códons	Número total de códons raros	Total de códons raros (%)
DENVE3	99	11	11,11
CHIKVE2	427	63	14,75
ZIKVNS1	356	57	16,01
DENVNS1	356	57	16,01

Fonte: Dados da pesquisa

Após essa avaliação e com o intuito de tentar resolver os problemas encontrados na expressão, possivelmente causados pela presença de códons raros na sequência dos genes de interesse, a expressão foi realizada na linhagem Rosetta(DE3) que contém códons raramente usados em *E. coli*.

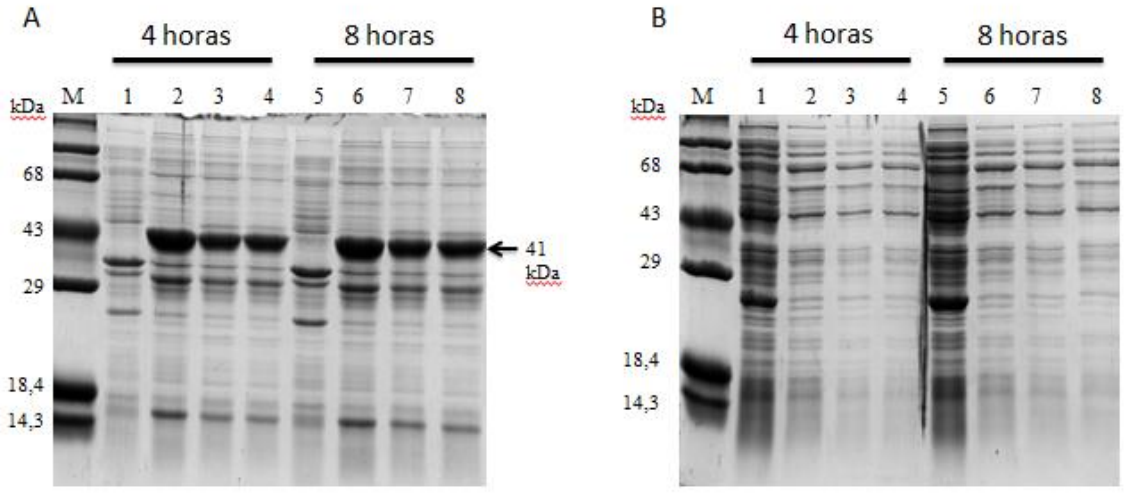
5.3.1 Teste de expressão das proteínas em linhagem Rosetta(DE3)

Colônias de bactérias da linhagem Rosetta(DE3) transformadas com os vetores de expressão recombinantes foram selecionadas para os testes de expressão.

A análise dos testes de expressão mostrou que as proteínas recombinantes DENVNS1, ZIKVNS1, DENVE3 e CHIKVE2 foram produzidas de forma insolúvel (figuras 16, 17,18 e 19).

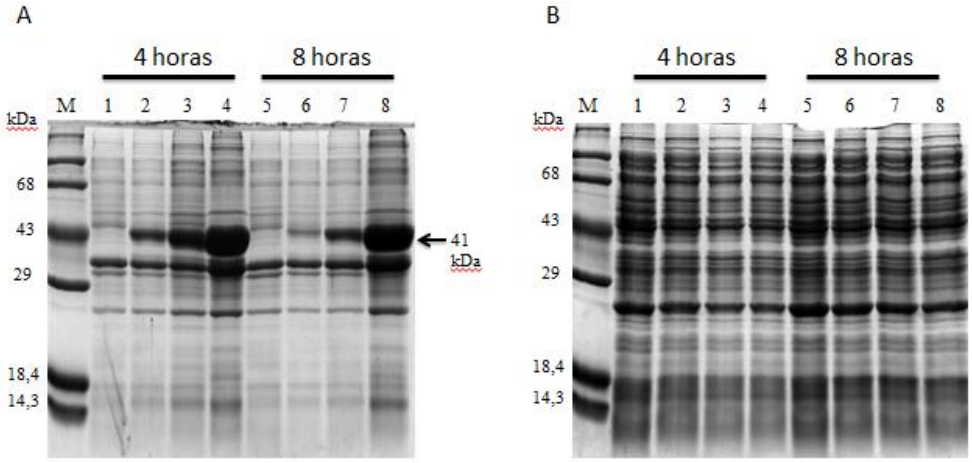
A expressão das proteínas DENVNS1 e ZIKVNS1 dependem da concentração de IPTG sendo que, na concentração de 1 mM observou-se maior expressão da proteína e que, os tempos de indução de 4 h e 8 h apresentaram os mesmos níveis de expressão (FIGURAS 16 e 17).

Figura 16: Teste de expressão da DENVNS1 a 37°C em Rosetta(DE3). Eletroforese SDS-PAGE 12% das frações insolúvel (A) e solúvel (B) mostrando em M: marcador de massa molecular *Protein Molecular Weight Standards* (Life Technologies); 1 e 5 : Proteínas produzidas por cultura de bactérias recombinante e não-induzida; 2: Proteínas após indução da expressão com 0,1 mM de IPTG; 3: Proteínas após indução da expressão com 0,5 mM de IPTG; 4: Proteínas após indução da expressão com 1,0 mM de IPTG; 6: Proteínas após indução da expressão com 1,0 mM de IPTG; 7: Proteínas após indução da expressão com 0,5 mM de IPTG; 8: Proteínas após indução da expressão com 0,1 mM de IPTG.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 17: Teste de expressão da ZIKVNS1 a 37°C em Rosetta(DE3). Eletroforese SDS-PAGE 12% das frações insolúvel (A) e solúvel (B) mostrando em M: marcador de massa molecular *Protein Molecular Weight Standards* (Life Technologies); 1 e 5: proteínas produzidas por cultura de bactérias recombinantes e não induzida; 2: proteínas produzidas na cultura induzida com 0,1 mM de IPTG; 3: proteínas produzidas na cultura induzida com 0,5 mM de IPTG; 4: proteínas produzidas na cultura induzida com 1,0 mM de IPTG; 6: proteínas produzidas na cultura induzida com 0,1 mM de IPTG; 7: proteínas produzidas na cultura induzida com 0,5 mM de IPTG; 8: proteínas produzidas na cultura induzida com 1,0 mM de IPTG.



A análise dos géis de poliacrilamida permitiu identificar que a proteína recombinante NS1 está sendo produzida e armazenada em corpos de inclusão, o que está de acordo com os resultados relatados em outros estudos (HUANG et al., 2001; WU et al., 2003). Houve surgimento de proteínas com a massa molecular esperada somente na fração insolúvel da preparação proteica.

Nas figuras 18 e 19 observam-se a expressão da proteína DENVE3 e CHIKVE2, respectivamente. A concentração de 0,1 mM induziu de maneira mais eficiente a expressão da proteína quando comparado às demais concentrações testadas. Não houve influência do tempo de indução (4 h e 8 h) nos níveis de expressão encontrados. Outros estudos também apresentaram bons níveis de expressão heteróloga utilizando uma concentração de 0,1 mM de IPTG (EINSFELDT et al., 2011; LARENTIS et al., 2011).

Esse resultado é interessante considerando que a utilização de menores quantidades de IPTG torna o processo de produção mais barato além de minimizar sua influência negativa no crescimento celular (MARBACH; BETTENBROCK, 2012). Esta influência foi atribuída a diversos fatores, entre eles a indução de alterações no metabolismo celular do hospedeiro, como o aumento na síntese de proteases intracelulares, quando comparado com a indução por lactose, afetando a estabilidade das proteínas produzidas (KILIKIAN et al., 2000).

Apesar de o IPTG ser amplamente utilizado e proporcionar rápida indução, estudos sugerem que a lactose pode ser um indutor mais adequado para expressão de proteínas heterólogas em linhagens como a BL21(DE3) (DVORAK et al., 2015), além de ser fonte de carbono e energia para a célula hospedeira (KILIKIAN, 2000).

FIGURA 18: Teste de expressão da DENVE3 a 37°C em Rosetta(DE3). Eletroforese SDS-PAGE 12% das frações insolúvel (A) e solúvel (B) mostrando em M: marcador de massa molecular *Protein Molecular Weight Standards* (Life Technologies); 1 e 5 : Proteínas produzidas por cultura de bactérias recombinante e não-induzida; 2: Proteínas após indução da expressão com 0,1 mM de IPTG; 3: Proteínas após indução da expressão com 0,5 mM de IPTG; 4: Proteínas após indução da expressão com 1,0 mM de IPTG; 6: Proteínas após indução da expressão com 0,1 mM de IPTG; 7: Proteínas após indução da expressão com 0,5 mM de IPTG; 8: Proteínas após indução da expressão com 1,0 mM de IPTG.

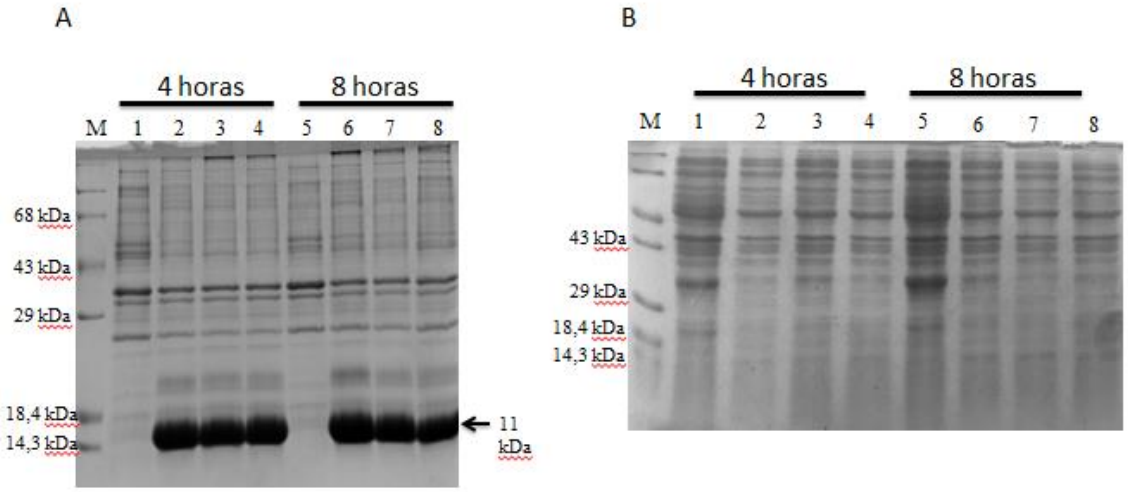
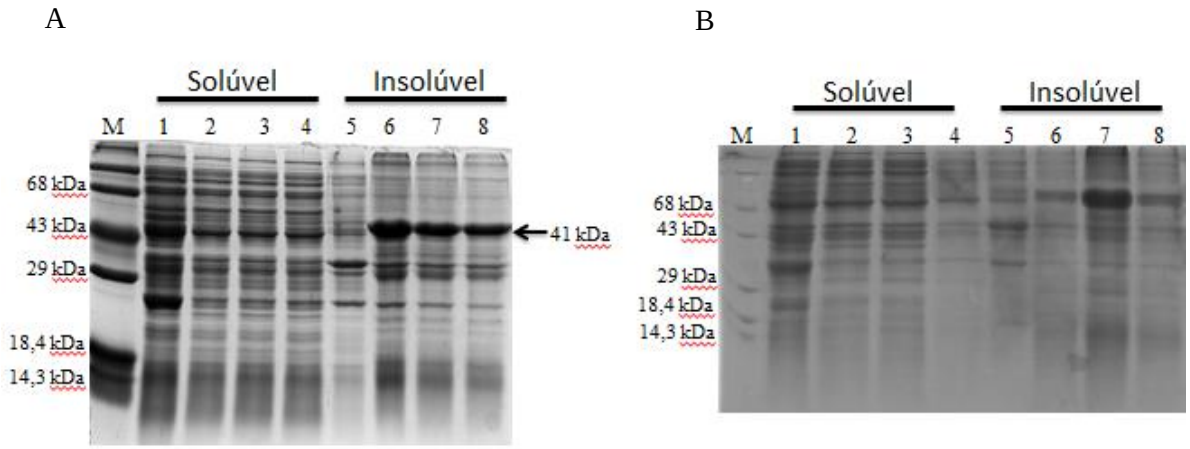


FIGURA 19: Teste de expressão da CHIKVE2 a 37°C em Rosetta(DE3). Eletroforese SDS-PAGE 12% dos períodos de indução de 4 horas (A) e 8 horas (B) mostrando em M: marcador de massa molecular *Protein Molecular Weight Standards* (Life Technologies); 1 e 5 : Proteínas produzidas por cultura de bactérias recombinante e não-induzida; 2: Proteínas após indução da expressão com 0,1 mM de IPTG; 3: Proteínas após indução da expressão com 0,5 mM de IPTG; 4: Proteínas após indução da expressão com 1,0 mM de IPTG; 6: Proteínas após indução da expressão com 0,1 mM de IPTG; 7: Proteínas após indução da expressão com 0,5 mM de IPTG; 8: Proteínas após indução da expressão com 1,0 mM de IPTG.



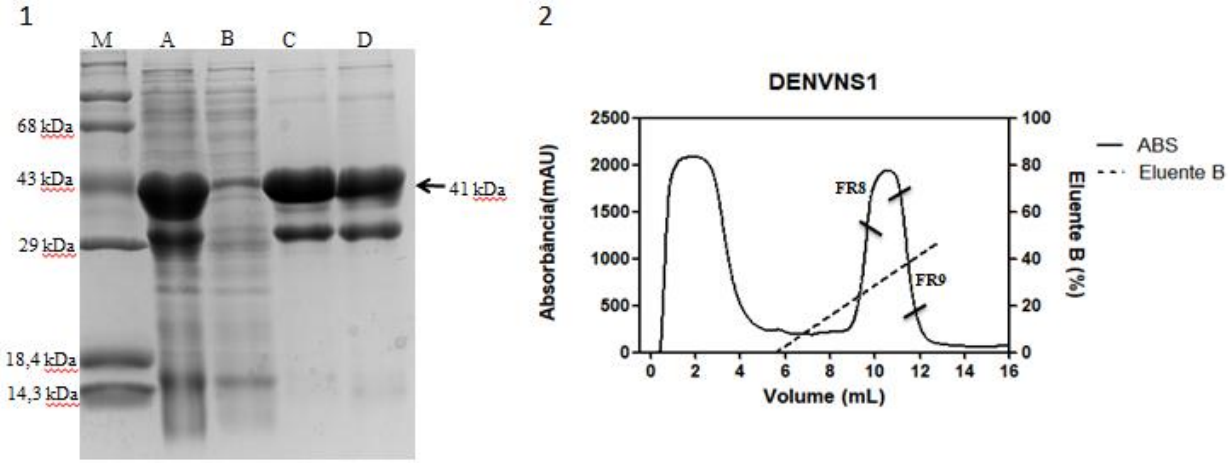
6 Purificação

Baseado nos resultados dos testes de expressão em volumes de 10 mL foram realizados os ensaios em maior escala. As condições de expressão para DENVNS1 e ZIKVNS1 foram: temperatura de 37ºC, 1,0 mM de IPTG e tempo de indução de 4 h. Para a expressão das proteínas DENVE3 e CHIKVE2 houve alteração somente da concentração de IPTG para 0,1 mM. O volume de expressão foi de 250 mL.

Após os passos de desnaturação, as frações insolúveis contendo as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel. A eluição foi realizada por gradiente de imidazol conforme descrito no item 4.9 de Materiais e Métodos.

Na figura 19 está apresentada a fração insolúvel contendo a proteína DENVS1 antes e após o processo purificação. As frações foram recolhidas em alíquotas de 1 mL.

Figura 20: Purificação da proteína DENVNS1. (1): Resultado da purificação da fração proteica insolúvel contendo DENVNS1 por cromatografia de afinidade ao níquel. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com *Comassie Blue*, mostrando em **M:** marcador de massa molecular *Protein Molecular Weight Standards* (Life Technologies)**; A**: amostra antes da aplicação na coluna; **B**: Conjunto de proteínas não-ligadas (fração 1); **C**: Fração 8 da eluição; **D:** Fração 9 da eluição . "Seta preta" indica a proteína com tamanho de aproximadamente 41 kDa; **(2): Perfil de cromatografia por afinidade ao Níquel para a purificação da DENVNS1**. A proteína recombinante saiu nas frações 7, 8 e 9. Cada fração foi recolhida com 1 mL. Eluente B se refere ao Tampão de Eluição (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, Ureia 8 M, Imidazol 500 mM, pH 8,0).

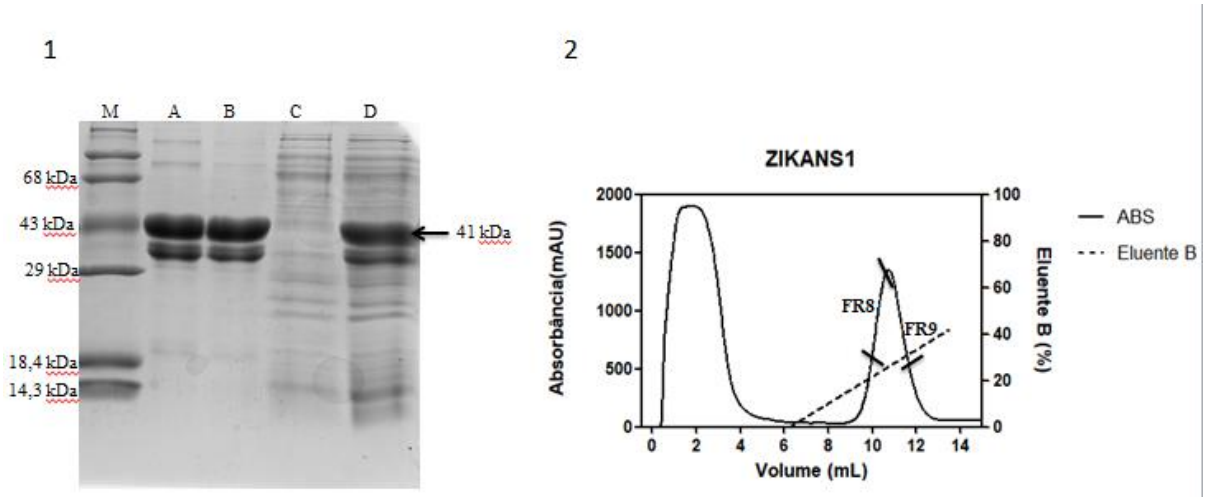


A fração não-ligada, que se refere à fração 1 (1 mL), aparece com várias proteínas e é possível identificar uma proteína com a massa molecular esperada para a proteína recombinante DENVNS1. A presença dessa proteína na fração não ligada pode ser devido a saturação da capacidade da coluna ou por limite de tempo para a ligação da proteína na coluna. Observa-se na fração 8 e 9 que houve eluição de uma proteína recombinante com a massa molecular de aproximadamente 41 kDa e algumas impurezas. Um fragmento menor pode ser observado, sugerindo que a proteína recombinante de interesse pode ter sido alvo de proteases celulares. Esse resultado corrobora com estudos anteriores de expressão da proteína NS1 recombinante que detectaram proteínas de massas moleculares de aproximadamente 43 e 32 kDa nos extratos proteicos insolúveis e ambas reagiram com anticorpo Anti-His (AMORIM et al., 2010). Athmaram e colaboradores, sugerem que o tipo de meio utilizado no cultivo bacteriano tem papel significativo na estabilidade proteica, possivelmente podendo ocasionar o aparecimento de proteínas com menor massa molecular devido a degradação proteica. Esses autores demonstraram que, em meio Terrific modificado 2 e Terrific modificado 3, a proteína

recombinante expressa não sofreu degradação, enquanto que em outros tipos de meios utilizados no estudo houve alguma degradação resultando em um fragmento proteico abaixo do tamanho esperado para a proteína NS1 recombinante (ATHMARAM et al., 2013).

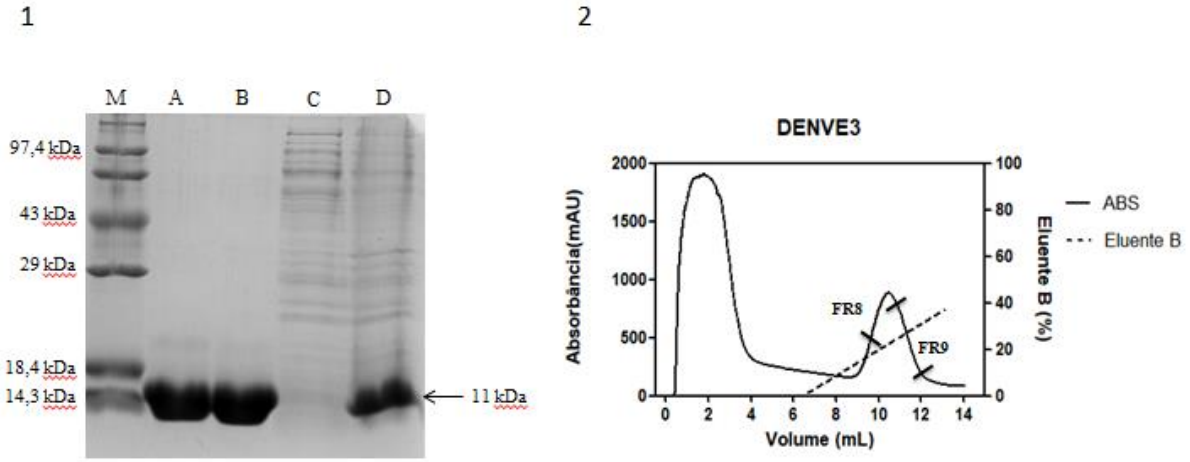
A figura 21 mostra que a fração não ligada apesar conter muitas proteínas não apresenta proteína de massa molecular esperada para ZIKVNS1. Isso indica que não houve perda da proteína recombinante por limite de satuação ou falta de ligação. A proteína NS1 de Zika foi eluída nas frações 8 e 9 do processo de purificação e observa-se, assim como na purificação da proteína DENVNS1, uma proteína adicional de massa molecular menor.

Figura 21: Purificação da proteína ZIKVNS1. (1): Resultado da purificação da proteína ZIKVNS1 por cromatografia de afinidade ao níquel. SDS-PAGE 12% corado com *Comassie Blue*, mostrando em **M:** marcador de massa molecular *Protein Molecular Weight Standards* (Life Technologies)**; A**: Fração 9 da eluição; **B**: Fração 8 da eluição; **C**: Fração do lavado referente às proteínas que não se ligaram na coluna (fração 1); **D:** Amostra antes da aplicação na coluna. "Seta preta" indica a proteína com tamanho de aproximadamente 41 kDa; (**2): Perfil de cromatografia por afinidade ao Níquel para a purificação da ZIKVNS1.** A proteína recombinante saiu nas frações 7, 8 e 9. Cada fração foi recolhida com 1 mL. Eluente B se refere ao Tampão de Eluição (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, Ureia 8 M, Imidazol 500 mM, pH 8,0).



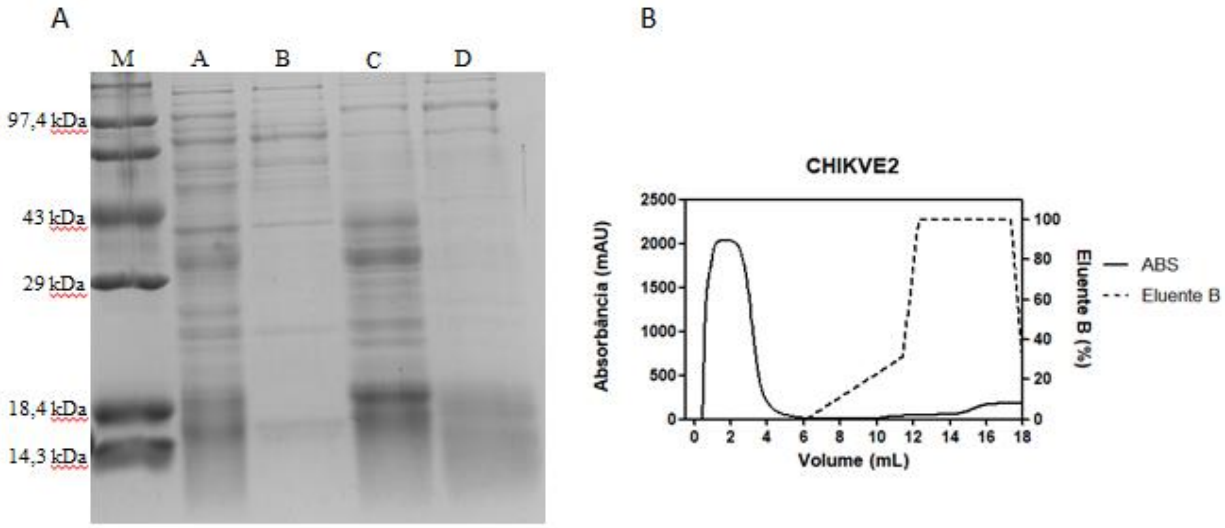
Na figura 22 é possível observar a proteína recombinante com massa molecular de aproximadamente 11 kDa nas frações 8 e 9 (frações referentes ao pico de absorbância) e, aparentemente, não existem impurezas nessas frações. O gráfico da figura mostra o perfil da cromatografia de afinidade para a purificação da proteína DENVE3.

Figura 22: Purificação da proteína DENVE3. (1): Análise da purificação da DENVE3 por cromatografia de afinidade ao níquel. SDS-PAGE 12% corado com *Comassie Blue*, mostrando em **M:** marcador de massa molecular *Protein Molecular Weight Standards* (Life Technologies)**;** **A**: Fração 9 da eluição; **B**: Fração 8 da eluição; **C**: Fração do lavado referente às proteínas que não se ligaram na coluna (fração 1); **D:** Amostra antes da aplicação na coluna. "Seta preta" indica a proteína com tamanho de aproximadamente 11 kDa; **(2): Perfil de cromatografia por afinidade ao Níquel para a purificação da DENVE3.** A proteína recombinante saiu nas frações 7, 8 e 9. Cada fração foi recolhida com 1 mL. Eluente B se refere ao Tampão de Eluição (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, Ureia 8 M, Imidazol 500 mM, pH 8,0).



Em relação à purificação da proteína CHIKVE2 não foi possível observar nenhum pico de absorbância no perfil de cromatografia de afinidade ao níquel. A SDS-PAGE realizada após a purificação não apresentou nenhuma banda referente ao tamanho esperado (47 kDa) para a proteína (figura 23). Apesar de ter sido expressa nos testes de expressão, observa-se, diante desses resultados, que não foi possível produzir a proteína CHIKVE2 em maior escala, nas condições utilizadas.

Figura 23: Purificação da proteína CHIKVE2. (A) Análise da purificação da CHIKVE2 por cromatografia de afinidade ao níquel. SDS-PAGE 12% corado com *Comassie Blue*, mostrando em **M:** marcador de peso molecular Protein Molecular Weight Standards (Life Technologies)**; A**: amostra aplicada na coluna; **B**: fração não-ligada; **C**: Fração 8; **D:** Fração 9; **(B) Perfil de cromatografia por afinidade ao Níquel para a purificação da CHIKVE2.** Eluente B se refere ao Tampão de Eluição (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, Ureia 8 M, Imidazol 500 mM, pH 8,0).



7 Quantificação de proteínas

Baseado no método de (BRADFORD, 1976), a concentração final das frações contendo as proteínas recombinantes purificadas estão apresentadas na tabela abaixo. Para a quantificação foram utilizadas as amostras que passaram pelo processo de solubilização dos corpos de inclusão, mas não pelo processo de purificação (ou seja, amostras que foram aplicadas na coluna), a fração que não se ligou a coluna, e duas frações referentes ao pico para cada uma das proteínas expressas.

TABELA 6: Concentração de proteínas presentes nas frações purificadas das proteínas ZIKVNS1, DENVNS1, DENVE3 e CHIKVE2. (FR): Fração

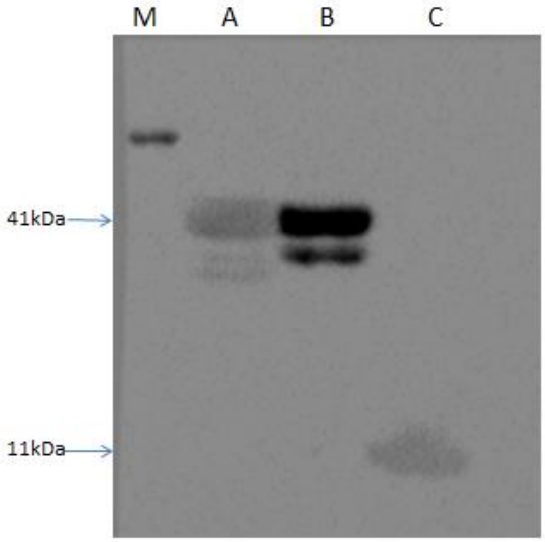
Amostra	Concentração de proteína totais (mg/mL)
ZIKVNS1 aplicada	1,43
ZIKVNS1 FR não ligada	0,46
ZIKVNS1 FR7	0,18
ZIKVNS1 FR8	0,77
ZIKVNS1 FR9	0,91
DENVNS1 aplicada	1,71
DENVNS1 FR não ligada	0,76
DENVNS1 FR7	0,48
DENVNS1 FR8	1,39
DENVNS1 FR9	1,35
DENVE3 aplicada	1,20
DENVE3 FR não ligada	0,41
DENVE3 FR7	0,52
DENVE3 FR8	0,77
DENVE3 FR9	0,70
CHIKVE2 aplicada	0,99
CHIKVE2 FR não ligada	0,07
CHIKVE2 FR7	-0,07
CHIKVE2 FR8	0,19
CHIKVE2 FR9	0,58

Fonte: Dados da pesquisa

8 Imunodetecção das proteínas recombinantes por *Western Blotting*

Para detectar a expressão das proteínas recombinantes produzidas foi realizado teste de *Western Blotting*. De acordo com a figura 24, o anticorpo primário anti-HisTag em uma diluição de 1:8000 foi eficiente no reconhecimento das três proteínas testadas: DENVNS1, ZIKVNS1 e DENVE3.

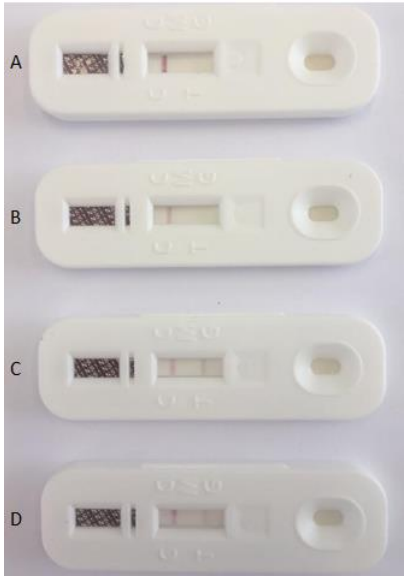
Figura 24: Membrana de nitrocelulose mostrando o resultado de *Western Blotting* das proteínas recombinantes expressas em *E. coli*. As amostras foram incubadas com o anticorpo primário Anti-His na diluição de 1:8000 e secundário anti-mouse na diluição de 1:10000. M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope* (Bio-Rad); A: amostra purificada da proteína DENVNS1; B: amostra purificada da proteína ZIKVNS1; C: amostra purificada da proteína DENVE3. As setas pretas indicam a altura e massa molecular das proteínas recombinantes expressas.



9 Detecção da proteína recombinante DENVNS1 por Teste imunocromatográfico rápido

O Imuno-RÁPIDO Dengue NS1 da WAMA é um teste imunocromatográfico para detecção qualitativa da presença do antígeno NS1. Na figura 25 podemos observar que o soro bovino fetal reage apenas com a linha controle, indicando o correto funcionamento do teste e há ausência da linha teste indicando resultado negativo para a presença do antígeno NS1. A proteína recombinante ZIKVNS1 foi diluída em SBF (soro bovino fetal) e não houve detecção na linha teste, comprovando a especificidade do teste rápido imunocromatográfico. Em C e D observamos o aparecimento da linha controle e da linha teste comprovando que a proteína recombinante DENVNS1 produzida neste trabalho foi reconhecida pelos anticorpos resultando no resultado positivo apresentado pelo teste.

Figura 25: Teste imunocromatográfico rápido para detecção do antígeno NS1 do vírus Dengue. A: Soro bovino fetal; B: Soro bovino fetal e amostra purificada da proteína ZIKVNS1; C e D: Soro bovino fetal e amostra purificada da proteína DENVNS1.



A proteína recombinante NS1 do vírus dengue, apesar de não ter passado pelo passo de *refolding*, foi reconhecida pelo teste rápido sugerindo que determinantes antigênicos foram preservados.

10. Conclusão

Os resultados apresentados permitem concluir que as bactérias da linhagem Rosetta(DE3) transformadas com o vetor de expressão pET28a recombinantes produziram, nas condições descritas no trabalho, as proteínas DENVNS1, ZIKVNS1 e DENVE3 que foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel e identificadas por SDS-PAGE e *Western-blotting.* Apesar de a clonagem ter sido bem sucedida, não foi possível a expressão da proteína CHIKVE2. A proteína DENVNS1 foi reconhecida por um teste imunocromatográfico rápido demonstrando seu potencial como antígeno para uso em testes diagnósticos.

11. Referencial bibliográfico

BRITO, A. C. DE; CORDEIRO, M. T. Review Article One year after the Zika virus outbreak in Brazil : from hypotheses to evidence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 49:537–543, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27812646>

AMORIM, J. H. *et al*. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal of Virological Methods**, 167:186–192, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399232>

ATHMARAM, T. N. *et al*. Optimization of Dengue-3 recombinant NS1 protein expression in *E. coli* and in vitro refolding for diagnostic applications. **Virus Gene**, 46:219–230, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23188193>

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, 10:411-21, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508629>

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, 22:1399–1408, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15529165>

BASSO, A. M. M. *et al*. Biopharmaceutical and Biosimilar Products in Brazil : From Political To Biotechnological Overview. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, 5:60–66, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4172/jbb.1000135>

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248–254, 1976. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>

BRASIL. Dengue : diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão**, 4:1-80, 2013. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/bvs>

BRASIL. Zika: abordagem clínica na atenção básica. **Ministério da Saúde, Secretaria de Gestão do trabalho e da educação na saúde**, 2016. Disponível em: < https://www.saude.pi.gov.br/>

BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, 48:1–10, 2017. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/bvs>

BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, 49:1–14, 2018. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/bvs>

CALVET, G. *et al*. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil : a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, 16:653–660, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108 >

CARRASCO, L.; SANZ, M.A.; GONZÁLEZ-ALMELA, E. The Regulation of Translation. **Viruses**, 10:1–28, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29419763 >

CLETON, N. *et al*. Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, 55:191–203, 2012. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22840968 >

COLT, S. *et al*. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids : A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 11:1-14, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28394887 >

DVORAK, P. *et al*. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21 (DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. **Microbial Cell Factories**, 14:1–15, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691337 >

EINSFELDT, K. *et al*. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* : Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth , recombinant protein production and plasmid stability. **Vaccine**, 29:7136–7143, 2011. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21651937>

LOPES, N. *et al*. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 55:55–64, 2014. Disponível em: <http://revista.iec.pa.gov.br/>

EYER-SILVA, W. D. A. *et al*. Case Report A case of chikungunya virus disease presenting with remarkable acute arthritis of a previously damaged finger joint. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 49:790–792, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28001232 >

FIOCRUZ. Pesquisa mostra como a zika afeta a vida de mulheres. ENSP. FIOCRUZ, 2018. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/pesquisa-mostra-como-zika-afeta-vida-das-mulheres>

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **Protein Journal**, 32:419–425, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897421>

GREGORY, C. J. et al. Modes of Transmission of Zika Virus. The Journal of infectious diseases, 16:875-883, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29267909

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, 11:480–496, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665979>

GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 951:13–24, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11797771>

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue / Dengue Hemorrhagic Fever : the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases Journal**, 1:55–57, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8903160 >

GUZMAN, M. G. *et al*. Dengue : a continuing global threat. **Nature Publishing Group**, 8:7–16, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079655>

HADINEGORO, S. R. *et al*. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. **New England Journal**, 373:1195–1206, 2015. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26214039>

HALL, B. G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. **Molecular biology and evolution**, 5:1229-35, 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23486614

HALSTEAD, S. B. Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. **Vaccine**, 35: 6355–6358, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29029938>

HAMMON W. M., RUDNICK A., SATHER G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, (3407):1102-3, 1960. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14399343

WILDER-SMITH, A. *et al*. Epidemic arboviral diseases : priorities for research and public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17:101–106, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28011234>

HASAN, S. S. *et al*. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses.. **Nature Structural & Molecular Biology**, 25:13–20, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29323278>

HUANG, J. L. et al. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. **Journal of medical virology**, 3:553-560, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11596093>

JEVSEVAR, S. *et al*. Production of Nonclassical Inclusion Bodies from Which Correctly. **Biotechnology Progress**, 21:632–639, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15801811>

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **SmithKline Beecham Pharmaceuticals**, 8:494–500, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579660>

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, 106:803-822, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28830778>

KILIKIAN, B. V. *et al*. Process strategies to improve heterologous protein production

in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. **Process Biochemistry**, 35:1019–1025, 2000. Disponível em: <https://www.journals.elsevier.com/process-biochemistry>

KIMURA R., HOTTA S. Studies on Dengue Fever (VI). On the Inoculation of Dengue Virus into Mice (in Japanese). **Nippom Igaku**, 3379:629-633, 1944.

KOLAJ, O. *et al*. Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factorie**s, 17:1–17, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19173718>

KURLAND, C.; GALLANTT, J. Errors of heterologous protein expression. **Current Opinion in Biotechnology**, 7:489–493, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939626>

LARENTIS, A. L. *et al*. Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. **Protein Expression and Purification**, 78:38–47, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362478>

LEMANT, J. *et al*. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005-2006.**Critical care medicine**, 9: 2536-41. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18679124>

LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 50:1–7, 2016. Disponível em: <https://www. http://www.rsp.fsp.usp.br/>

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**, 5:1101–1152, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362478>

LIU, Y.; LIU, J.; CHENG, G. Vaccines and immunization strategies for dengue prevention. **Emerging Microbes & Infections**, 8:77, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27436365>

MANSUY, J. M. *et al*. Zika virus in semen and spermatozoa. **The Lancet Infectious Diseases**, 16:1106–1107, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27676340>

MARBACH, A.; BETTENBROCK, K. lac operon induction in *Escherichia coli* : Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. **Journal of Biotechnology**, 157:82–88, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079752>

MENDES, A.; KUHN, R. J. Alphavirus Nucleocapsid Packaging and Assembly. 10:1–15, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869531/>

MUKHOPADHYAY, S. *et al*. Mapping the Structure and Function of the E1 and E2 Glycoproteins in Alphaviruses. **Structure**, 14:63–73, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407066>

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, 29:487–524, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27029595>

MUSTAFA, L. C. M. S. *et al*. ScienceDirect Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, 1:5–8, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407066>

NEUFELDT, C. J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, 16:125–142, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29430005>

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. Perspectives Zika : the new arbovirus threat for Latin America. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 9:684–685, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26142684>

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli : advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, 5:1–17, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24860555>

SAIKI R. K. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 4839:487-491.

SAMBROCK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T., Molecular Cloning, a Laboratory Manual. **Journal of Basic Microbiology**, 1989.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus.

Nature Reviews Microbiology, 8:491-500, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20551973>

STETTLER, K. *et al*. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, 353:823–827, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27417494>

TAUIL P. L.Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. **Epidemiol e Serviços Saúde,** 773–4, 2014. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/ress/2014.v23n4/773-774>

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production : from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 72:211–222, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791589>

VASCONCELOS, P. F. DA C. Doença pelo vírus Zika : um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 6:9–10, 2015. Disponível em: <http://revista.iec.pa.gov.br/>

WEAVER, S. C. *et al*. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. **Expert Review of Vaccines**, 11:1087–1101, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3562718/>

WU, S. *et al*. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. **Vaccine**, 21:3919–3929, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12922127>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases : report of a WHO scientific group. **World Health Organization**, 719:1–116, 1985. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/handle/10665/39922>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. **World Health Organization**, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/detail/>. Acesso em: 22 out. 2018

ANEXO

Tabela A1: Frequência de códons raros na sequência DENVE3.

Aminoácido	Códon Raro em *E. coli*	Nº de ocorrência de códons raros na sequência	Nº de códons referente ao aminoácidos na sequência	% de códons raros na sequência	Frequência de códons raros a cada 1000 códons em *E. coli**
Arginina	CGA	0	1	-	3,1
	CGG	0		-	4,6
	AGG	0		-	1,4
	AGA	1		100,0	2,1
Glicina	GGA	3	9	33,3%	7,0
	GGG	3		33,3%	9,7
Isoleucina	AUA	2	5	40%	4,1
Leucina	CUA	2	7	28,57%	3,2
Prolina	CCC	0	6	-	4,3
Treonina	ACG	0	9	-	1,4

Fonte: Dados da pesquisa. *(KANE,1995; SHARP, P. M. & LI, W., 1986).

Tabela A2: Frequência de códons raros na sequência CHIKVE2.

Aminoácido	Códon Raro em *E. coli*	Nº de ocorrência de códons raros na sequência	Nº de códons referente ao aminoácidos na sequência	% de códons raros na sequência	Frequência de códons raros a cada 1000 códons em *E. coli**
Arginina	CGA	3	23	13,04	3,1
	CGG	4		17,39	4,6
	AGG	5		21,73	1,4
	AGA	6		26,08	2,1
Glicina	GGA	10	27	37,03%	7,0
	GGG	8		29,62%	9,7
Isoleucina	AUA	6	21	28,57%	4,1
Leucina	CUA	5	29	17,24%	3,2
Prolina	CCC	4	31	12,90	4,3
Treonina	ACG	12	40	30,0	1,4

Fonte: Dados da pesquisa. *(KANE,1995; SHARP, P. M. & LI, W., 1986).

Tabela A3: Frequência de códons raros na sequência ZIKVNS1.

Aminoácido	Códon Raro em *E. coli*	Nº de ocorrência de códons raros na sequência	Nº de códons referente aos aminoácidos na sequência	% de códons raros na sequência	Frequência de códons raros a cada 1000 códons em *E. coli**
Arginina	CGA	0	25	-	3,1
	CGG	2		8,0 %	4,6
	AGG	10		40,0 %	1,4
	AGA	12		48%	2,1
Glicina	GGA	10	29	34,48%	7,0
	GGG	10		34,48%	9,7
Isoleucina	AUA	3	13	23,07%	4,1
Leucina	CUA	1	23	4,3 %	3,2
Prolina	CCC	7	19	36,84	4,3
Treonina	ACG	2	20	10,0 %	1,4

Fonte: Dados da pesquisa. *(KANE,1995; SHARP, P. M. & LI, W., 1986).

Tabela A4: Frequência de códons raros na sequência DENVNS1.

Aminoácido	Códon Raro em *E. coli*	Nº de ocorrência de códons raros na sequência	Nº de códons referente aos aminoácidos na sequência	% de códons raros na sequência	Frequência de códons raros a cada 1000 códons em *E. coli**
Arginina	CGA	2	16	12,5 %	3,1
	CGG	1		6,25 %	4,6
	AGG	1		6,25 %	1,4
	AGA	9		56,25 %	2,1
Glicina	GGA	16	30	53,33 %	7,0
	GGG	6		20,0%	9,7
Isoleucina	AUA	9	27	33,33%	4,1
Leucina	CUA	6	22	27,27 %	3,2
Prolina	CCC	4	15	26,66 %	4,3
Treonina	ACG	3	23	13,04 %	1,4

Fonte: Dados da pesquisa. *(KANE,1995; SHARP, P. M. & LI, W., 1986).

Figura A1: Identificação de clones recombinantes de DENVE3. M: marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb Ladder (Thermo Scientific)*; A: Controle negativo; B, C,D, E, G e H: colônias sem amplificação do inserto, F: Fragmento amplificado de colônia recombinante.

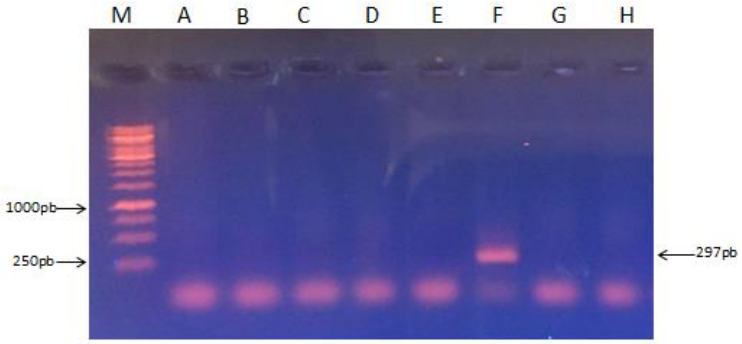


Figura A2: Amplificação das sequência DENVNS1, DENVE3 e ZIKVNS1.Gel de Agarose 1% corado com Gel Red mostrando amplificação de DENVNS1 (1056 pb), DENVE3 (297 pb) e ZIKVNS1 (1056 pb) por PCR realizada empregando-se pUC57_DENVNS1, pUC57_DENVE3 e pUC57_ZIKVNS1, respectivamente, como DNA molde. M: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Thermo Scientific); A, C e E: controle negativo da reação de PCR; B: Fragmento de DENVNS1 amplificado; D: Sequência de DENVE3 (297 pb) amplificada; F: Sequência de ZIKVNS1 (1056 pb) amplificada

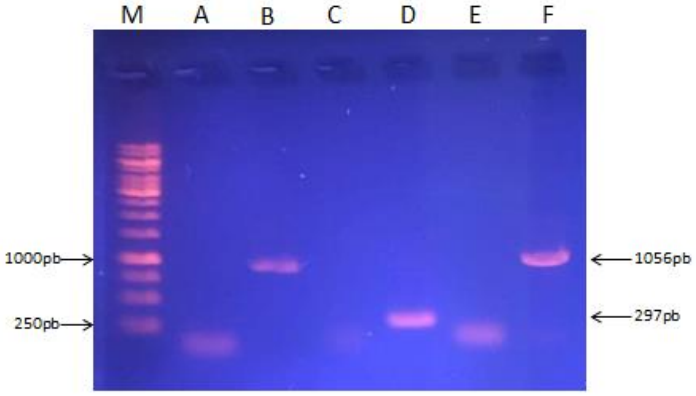
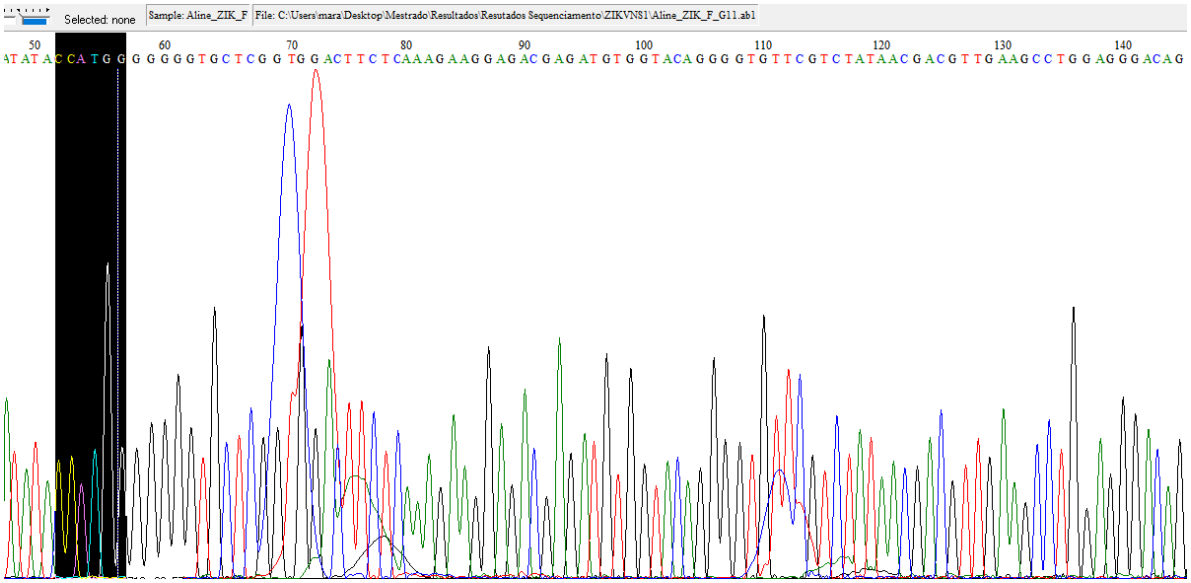


Figura A3: Eletroferograma representando parte da sequência obtida como resultado do sequenciamento nucleotídico via método de Sanger do vetor recombinante pET28a_ZIKVNS1 com os *primers T7 foward* (A) e *T7 reverse* (B). As imagens representam os sítios de clonagem do gene ZIKVNS1 no vetor pET28a e o sítio de restrição das enzimas *NcoI* (A) e *XhoI* (B) encontram-se em destaque.

A



B

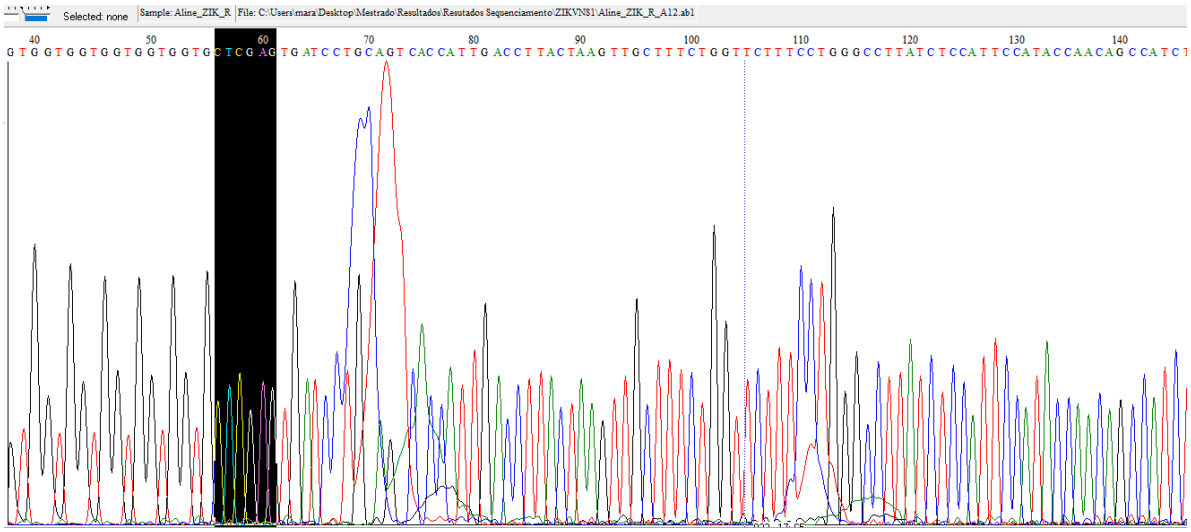
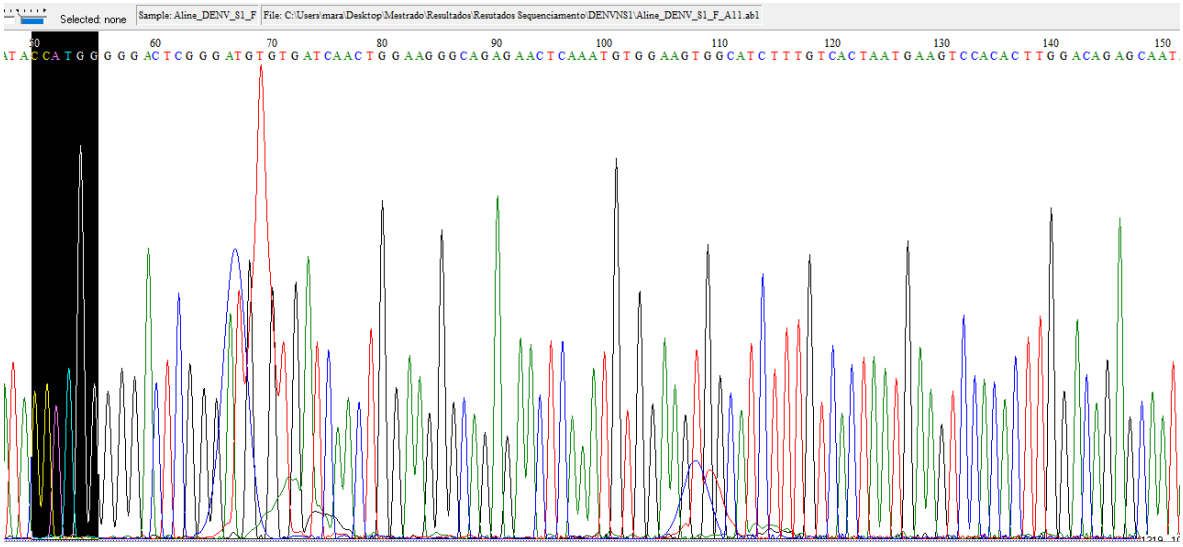


Figura A4: Eletroferograma representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do vetor recombinante pET28a_DENVNS1 com o *primer T7 foward* (A) e *primer T7 reverse* (B). Os sítios de restrição das enzimas *NcoI* (A) e *XhoI* (B) encontram-se em destaque.

A



B

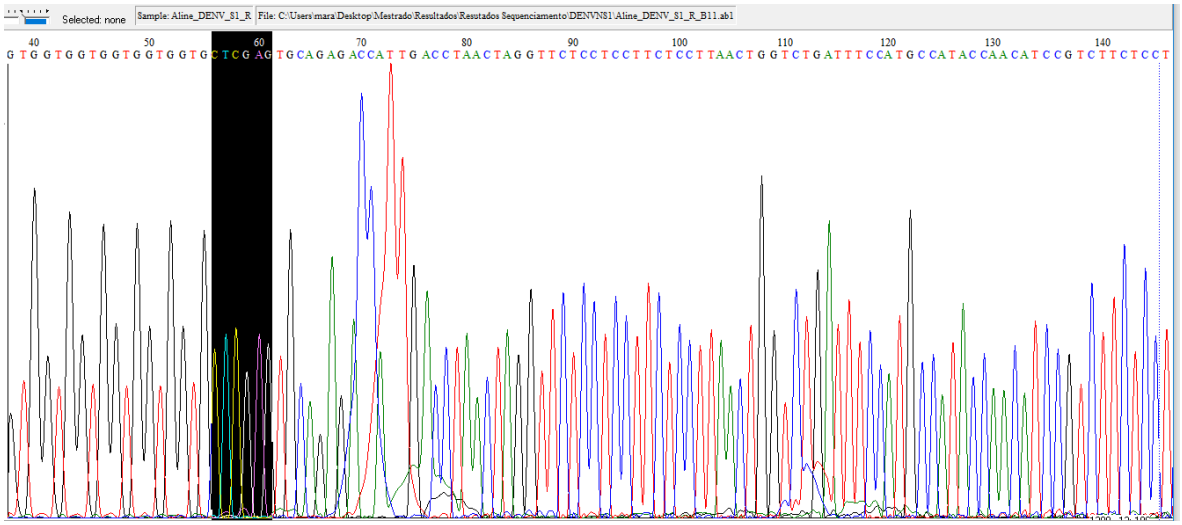
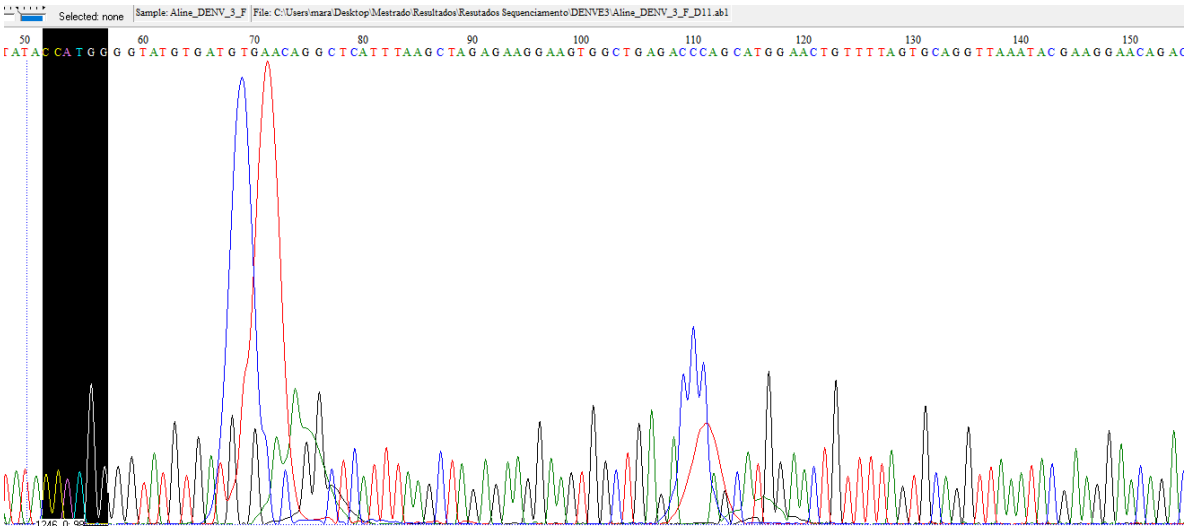


Figura A5: Eletroferograma representando parte da sequência obtida como resultado do sequenciamento nucleotídico via método de Sanger do vetor recombinante pET28a_DENVE3 com os *primers T7 foward* (A) e *T7 reverse* (B). As imagens representam os sítios de clonagem do gene DENVE3 no vetor pET28a e o sítio de restrição das enzimas *NcoI* (A) e *XhoI* (B) encontram-se em destaque.

A



B

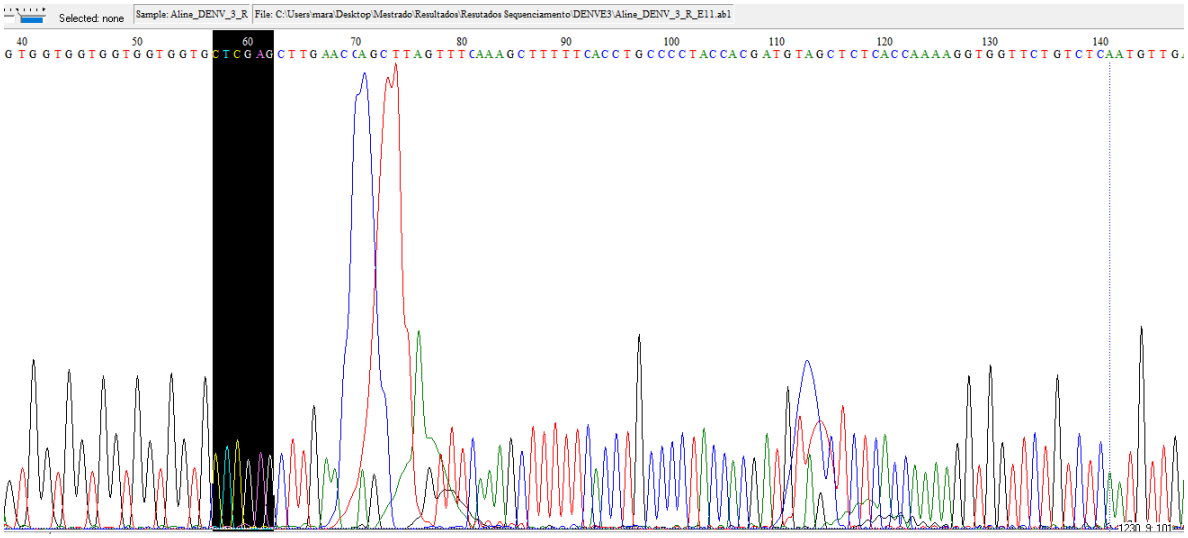
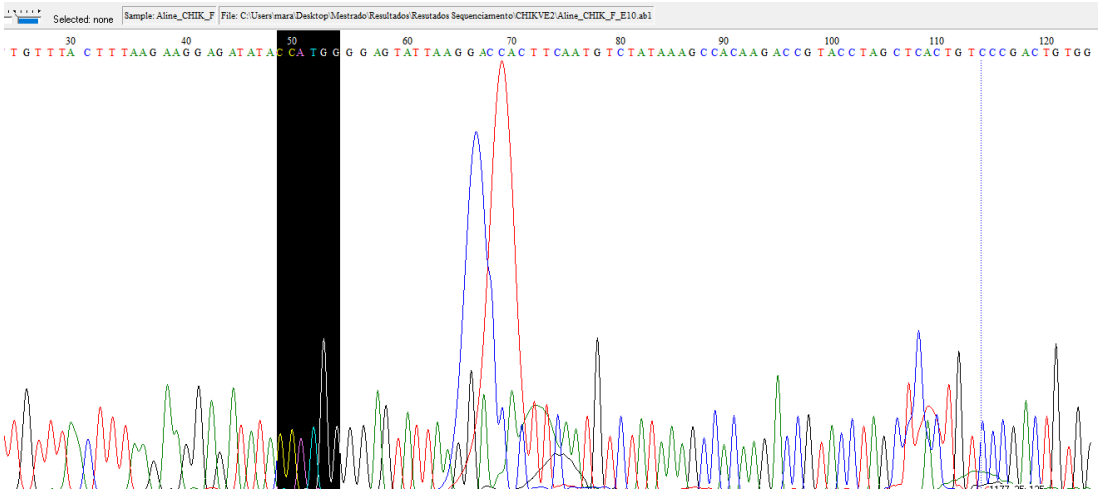


Figura A6: Eletroferograma representando parte da sequência obtida por meio do sequenciamento do vetor recombinante pET28a_CHIKVE2 com o *primer T7 foward.* O sítio de restrição da enzima *NcoI* encontra-se em destaque.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES