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

RESUMO

PEREIRA, A. S. **Expressão de proteínas recombinantes dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya para diagnóstico sorológico diferencial das viroses.** 2018. 91f. 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*.

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 (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 antígenicamente 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).

A dengue é considerada endêmica em mais de 100 países. No Brasil, no ano de 2015, mais de 1,68 milhão de casos prováveis foram registrados, e em 2016, mais de 1,50 milhão (BRASIL, 2017a). 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/sexta 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.

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).

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 vírus. 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 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*. 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 3) (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, conseqüentemente, 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 renovada 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 bactérias 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. 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.

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 Factories**, 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: <<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