

SAMUEL SANTOS PEREIRA

**Desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico
sorológico para tipagem da infecção prévia pelo vírus Dengue**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

São Paulo

2019

SAMUEL SANTOS PEREIRA

**Desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico
sorológico para tipagem da infecção prévia pelo vírus Dengue**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão Corrigida

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Santos Pereira, Samuel
Desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico sorológico para tipagem da infecção prévia pelo vírus Dengue / Samuel Santos Pereira; orientador Luis Carlos de Souza Ferreira . -- São Paulo, 2019.
77 p.

Dissertação (Mestrado) . -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. vírus Dengue. 2. Diagnóstico sorológico. 3. Proteína não estrutural 1 . 4. ELISA. I. de Souza Ferreira , Luis Carlos , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Samuel Santos Pereira

Titulo da Dissertação/Tese: Desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico sorológico para tipagem da infecção prévia pelo vírus Dengue

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado / Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o candidato:

() **Aprovado**

() **Reprovado**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico sorológico para tipagem da infecção prévia pelo vírus Dengue*", registrado sob o protocolo nº **33/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **01/06/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr. (a.) Luis Carlos de Souza Ferreira**

- Departamento: *Microbiologia*

- Membros da Equipe: *Lennon Ramos Pereira (Pós-graduando), Denicar Lina Nascimento Fabris (Pós-graduando), Samuel Santos Pereira (Pós-graduando), Robert Andreato Santos (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Development of new serological diagnostic strategies for typing prior Dengue virus infection*", protocol nº **33/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **6/1/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr. (a.) Luis Carlos de Souza Ferreira**

- Team members: *Lennon Ramos Pereira (Graduate Student), Denicar Lina Nascimento Fabris (Graduate Student), Samuel Santos Pereira (Graduate Student), Robert Andreato Santos (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	Balb/c	Macho/male	6-8 semanas/weeks	120

São Paulo, 30 de junho de 2017.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.63.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº 33/2017/CEUA, aprovado em 01/06/2017, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo "*Desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico sorológico para tipagem da infecção prévia pelo vírus Dengue*", de responsabilidade do Prof. Dr. **Luís Carlos de Souza Ferreira**, do Departamento de Microbiologia, para melhor processamento estatístico dos dados, bem como mudança de linhagem:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Mus musculus	AG129	Macho	6-8 semanas	80

São Paulo, 23 de abril de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho

Aos meus pais e irmãos,
pelo amor incondicional e por sempre sonharem comigo.

A Deus, pelo seu cuidado e proteção.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir executar este trabalho, mas principalmente, por seu meu refúgio em todos os momentos.

Aos meus familiares, pela torcida. Aos meus pais, Claudionor e Suely, por sempre me incentivarem. E aos meus irmãos, Matheus, João, Aline, Alice e Thiago, por serem o meu maior exemplo. Amo vocês!

Ao meu orientador, o professor Luís Carlos, pela confiança e imensa oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional. E especialmente, por nos incentivar ao aprendizado constante. Muito obrigado, professor!

À professora Rita, por também nos receber no laboratório sempre com carinho e atenção.

Ao Edu, por ser um profissional exemplar e sempre disposto a ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Carol, Patrícia, Roberta, Juliana, Mariângela, Tácita, Natiely, Luana, Karine, Jamile, Bruna, Fernanda, Lennon, Sara, Eric, Bruno, Robert, Marianna, Rúbens, Mônica, Aléxia, Nayara, Danielle, Fagner e Lukas, muito obrigado pelas contribuições, discussões e momentos de descontração. Vocês são excepcionais!

Aos amigos do grupo Dengue, Aléxia, Mônica, Rúbens, Marianna, Robert, Fernanda, Lennon e Deni, por me receberem no laboratório e por sempre estarem dispostos a contribuir! Muito obrigado, grupo!

Aos amigos, Bianca, Lennon, Aléxia, Hélic, Dalva, Tácita, Taiana e Jaqueline, por dividirem momentos de alegria e ansiedade. E por serem a minha família em São Paulo. Amo vocês!

Aos amigos da Universidade Estadual de Santa Cruz, pois mesmo distantes estão sempre na torcida. Ao professor Wilson Luiz, pela amizade, conselhos e incentivo!

Aos laboratórios de Evolução Molecular e Bioinformática do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, e Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da USP, pela disponibilidade e por compartilharem conhecimento.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, pela oportunidade, em especial, às secretarias do Departamento de Microbiologia e do Programa de Pós-graduação em Microbiologia por sempre auxiliarem na resolução dos problemas e dúvidas.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo 2017/09661-0) e da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (processo 712578) que permitiram a execução deste trabalho.

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapias Gênicas (CEVAT-GENE4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo 2017/09661-0) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (processo 1712578).

RESUMO

PEREIRA, S. S. **Desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico sorológico para tipagem de infecção prévia pelo vírus Dengue.** 2019. 77 f. Dissertação de (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A dengue é a arbovirose de maior impacto na saúde pública mundial. A doença é causada pelo vírus Dengue (DENV), o qual compreende quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus, como consequência a infecção por um deles não implica em proteção contra os sorotipos heterólogos. O diagnóstico clínico diferencial da dengue é difícil, por isso o diagnóstico laboratorial aparece como uma importante ferramenta para a confirmação dos casos suspeitos. Os testes sorológicos na plataforma de ELISA são amplamente utilizados na confirmação laboratorial da dengue, pois são sensíveis e de custo acessível. No entanto, apresentam especificidade comprometida, particularmente, em regiões onde circulam outras arboviroses. Nesse sentido, o objetivo desta proposta foi desenvolver estratégias de diagnóstico sorológico específico da dengue na plataforma de ELISA utilizando proteínas recombinantes baseadas em um fragmento da NS1 (nomeadas Δ NS1 dos DENVs 1-4). Os antígenos foram obtidos após expressão em sistema procarioto utilizando linhagens de *Escherichia coli* e purificados por cromatografia de afinidade. As proteínas recombinantes purificadas foram reconhecidas por soros de animais infectados pelos DENVs, sugerindo que as mesmas conservam epítomos conformacionais. As Δ NS1 dos DENVs 1-4 foram utilizadas em combinação como antígenos de fase sólida e permitiram a detecção de anticorpos gerados em animais infectados com os DENVs, sem a interferência de anticorpos gerados após infecção pelo ZIKV. Além disso, as Δ NS1 dos DENVs 1, 2 e 4 apresentaram maior reatividade com o soro do DENV homólogo. Os resultados obtidos são relevantes ao apresentarem novos imunobiológicos com antigenicidade, imunogenicidade preservadas e contribuem para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico sorológico específico para dengue.

Palavras-chave: vírus Dengue. Diagnóstico sorológico. Proteína Não Estrutural 1 (NS1). ELISA.

ABSTRACT

PEREIRA, S. S. **Development of a new serological diagnostic strategies for typing prior infection with Dengue virus.** 2019. 77 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Dengue is the arbovirose with larger impact on public health worldwide. The disease is caused by the Dengue virus (DENV), that comprises four antigenically distinct serotypes of the virus in such a way that infection by one then does not imply protection against the heterologous serotypes. The clinical diagnosis of dengue is hard and therefore the laboratory diagnosis is an important tool to confirm of suspected cases. Serological tests on the ELISA platform are widely used for dengue infection diagnosis, because they are sensitive and affordable. However, their specificity is compromised particularly in regions where others arboviruses prevail. Therefore, the aim of this study was to develop specific serological diagnostic strategies for dengue in the ELISA platform using recombinant proteins developed from a fragment of NS1 protein (named Δ NS1 of the DENVs 1-4). The antigens were obtained after expression in prokaryotic system using *Escherichia coli* strains and purified by affinity chromatography. Importantly, the purified recombinant proteins were recognized by sera from animals infected by DENVs, suggesting that Δ NS1 antigens have their conformational epitopes preserved. Moreover, the Δ NS1 of DENVs 1-4 were used in combination as solid phase antigens and allowed the detection of DENV in the sera from infected animals, without cross reaction with antibodies after ZIKV infection. In addition, the Δ NS1 of the DENVs 1, 2 and 4 showed higher reactivity with the sera of the homologous DENV, thus indicating their potential as tools to specifically identify DENV serotypes. The results are relevant and present novel immunobiologicals with preserved antigenicity, immunogenicity and can contribute to the development of new serological diagnostic strategies specific for dengue infection.

Keywords: Dengue virus. Serological diagnostic. Non structural protein 1 (NS1). ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O vírus Dengue: representação da partícula e do genoma viral.	23
Figura 2 - A dinâmica da infecção e o diagnóstico da dengue.	24
Figura 3 - Vetores de expressão das proteínas Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4).	33
Figura 4 - Análise do perfil de hidrofobicidade das proteínas Δ NS1 dos DENVs.	44
Figura 5 - Identificação de epítomos de células B para as proteínas recombinantes dos DENVs.	45
Figura 6 - Análise de restrição dos vetores de expressão das proteínas recombinantes Δ NS1 dos DENVs.	46
Figura 7 - Expressão das proteínas recombinantes Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4) em sistema procarioto.	47
Figura 8 - Teste de expressão das proteínas recombinantes Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4) em <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).	48
Figura 9 - Otimização das condições de purificação das proteínas recombinantes Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4).	49
Figura 10 - Purificação das proteínas Δ NS1 dos DENVs.	50
Figura 11 - Distribuição da medida de tamanho das proteínas Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4).	51
Figura 12 - Avaliação antigênica das proteínas recombinantes Δ NS1 dos vírus Dengue 1, 2, 3 e 4.	52
Figura 13 - Imunogenicidade das proteínas recombinantes Δ NS1 dos vírus Dengue 1, 2, 3 e 4.	54
Figura 14 - Produção de soro monoespecífico contra os vírus Dengue e ZIKV.	55
Figura 15 - Caracterização dos soros monoespecíficos contra os vírus Dengue 1-4.	56
Figura 16 - Avaliação da especificidade das proteínas Δ NS1 frente à amostra de soro de animal infectado com ZIKV.	57
Figura 17 - Avaliação das proteínas Δ NS1 DENVs 1-4 no diagnóstico específico da dengue.	58
Figura 18 - Validação das proteínas Δ NS1 para o diagnóstico da dengue com painel de soro murino.	59

Figura 19 – Validação das proteínas Δ NS1 para o diagnóstico da dengue com amostra de soro humano.	60
Figura 20 - Validação das proteínas Δ NS1 dos DENVs como antígeno sorotipo-específico.	61
Figura 21 - Sorotipagem da infecção pelos DENVs com as proteínas Δ NS1.	62
Figura 22 - Sorotipagem da infecção pelos DENVs com as proteínas Δ NS1 desnaturadas.	63
Figura 23 - Obtenção da proteína Δ NS1 do DENV3 para sorotipagem de infecção pelos DENVs.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Testes comerciais registrados no Brasil para diagnóstico da dengue	27
Tabela 2 - Tampões para expressão, <i>refolding</i> e purificação das proteínas Δ NS1 dos vírus Dengue	36
Tabela 3 - Percentual de identidade da sequência de aminoácidos das Δ NS1 dos DENVs	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem

°C: graus celsius

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DENV: vírus Dengue

DLS: *Dynamic Light Scattering*

DNA: ácido desoxorribonucléico

DO: densidade ótica

E: proteína do envelope

ELISA: *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

HI: Inibição da hemaglutinação

IgG: imunoglobulina G

IMAC: Cromatografia de afinidade por íons metálicos

IPTG: isopropil β -D-1 tiogalactopiranosídeo

JEV: vírus da Encefalite Japanosa

kDa: quilodalton

L: litro

LB: Meio Luria-Bertani

LT1: toxina termolábil tipo 1

M: molar

MAC-ELISA: ELISA para captura de anticorpos IgM

MEM: meio mínimo essencial de Eagle

MOI: multiplicidade de Infecção

mg: miligrama

ml: mililitro

mM: milimolar

m/v: razão massa/volume

ng: nanograma

nm: nanômetro

NS: Proteína não estrutural

NS1: Proteína não estrutural1

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Pan-americana de Saúde

OPD: *o-Phenylenediamine*

PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*

pb: pares de base

PBS: salina tamponada fosfatada

PCR: *polymerase chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)

pH: potencial hidrogeniônico

PMSF: *phenylmethanesulfonylfluoride*

prM: proteína precursora de membrana

PRNT: *Plaque reduction neutralization test*

RNA: ácido ribonucléico

ROC: *Receiver Operating Characteristics*

rpm: rotações por minuto

SDS: sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

TB: meio de cultura *TerrificBroth*

VLP: *Virus Like Particle*

WNV: vírus do Oeste do Nilo

ZIKV: vírus Zika

μL : microlitro

μg : micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	O VÍRUS DENGUE: IMPORTÂNCIA E IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO	21
1.2	O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DENGUE	23
1.3	A PROTEÍNA NS1 E O DIAGNÓSTICO DA DENGUE	29
1.4	IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO	30
2	OBJETIVOS	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Δ NS1 DOS DENVs 1-4	32
3.1.1	DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Δ NS1 DOS DENVs	32
3.1.2	OBTENÇÃO E ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Δ NS1 DOS DENVs (1, 2, 3 E 4)	32
3.1.3	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVs (1, 2, 3 E 4)	33
3.1.4	EXPRESSÃO EM MAIOR ESCALA, REFOLDING E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVs (1, 2, 3 E 4)	34
3.1.5	IMUNODETECÇÃO POR ENSAIO DE WESTERN BLOTTING	36
3.1.6	IMUNODETECÇÃO POR ENSAIO DE DOT BLOT	37
3.1.7	ELISA DE ANTIGENICIDADE	37
3.1.8	IMUNOGENICIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	38
3.1.9	ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ (DLS)	39
3.2	AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DENVs 1-4 NO DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DA DENGUE	39
3.2.1	DETECÇÃO MOLECULAR DOS DENVs E ZIKV	39
3.2.2	PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE EM MODELO MURINO	40
3.2.3	DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE	40
3.2.4	ENSAIO DE ELISA PARA DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DA DENGUE	41
3.3	AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DENVs 1-4 NA IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS	41
3.3.1	DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE Δ NS1 DENVs 1-4 FRENTE AOS SOROTIPOS DO DENV	41
3.3.2	<i>ENSAIO DE ELISA PARA IDENTIFICAÇÃO DO SOROTIPO DO VÍRUS DENGUE</i>	42
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
4	RESULTADOS	43

4.1 AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Δ NS1 DOS DENVs	43
4.2 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVs (1, 2, 3 E 4)	45
4.3 PURIFICAÇÃO, ANTIGENICIDADE E IMUNOGENICIDADE DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVs (1, 2, 3 E 4)	48
4.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO MONOESPECÍFICO AOS DENVs	54
4.5 ESPECIFICIDADE DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVs	56
4.6 ENSAIOS DE SOROTIPAGEM COM A PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVs	60
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 O VÍRUS DENGUE: IMPORTÂNCIA E IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO

A dengue consiste na mais importante infecção viral transmitida aos seres humanos por vetores artrópodes (1). A doença, causada pelo vírus Dengue (DENV), é caracterizada como febril e autolimitada, e existem quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus (DENVs 1-4). A infecção por um dos DENVs confere imunidade sorotipo-específica de longa duração, entretanto, imunidade cruzada contra o sorotipo heterólogo pode ser observada por um curto período (1). O DENV pertence ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae*, grupo que compreende mais de 70 espécies diferentes de vírus de grande impacto na saúde pública mundial, como o vírus Zika (ZIKV), vírus da Febre Amarela (YFV), vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o vírus da Encefalite Japonesa (JEV) (2,3).

Estima-se que metade da população mundial esteja em áreas de risco para infecção pelo DENV, e a Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que mais de cem países já relataram casos da doença (2,3). Além disso, uma preocupação pertinente é a expansão do vírus para regiões não endêmicas, como os Estados Unidos e países da Europa (2). Anualmente, são registrados mais de 50 milhões de casos de dengue em todo o mundo, mas acredita-se que esse número esteja subestimado, pois cerca de 75-80 % dos casos são de doença assintomática e não diagnosticada. Do total de casos registrados, 500 mil correspondem à dengue grave, que resultam em 20.000 mortes por ano (4,7).

Desde 2010 circulam no Brasil os quatro sorotipos do DENV, responsáveis por epidemias cíclicas da doença que apenas nos anos de 2017 e 2018 levaram a aproximadamente 250 mil casos anuais prováveis da doença identificados pelo Ministério da Saúde. Atualmente, são mais de 100 mil casos prováveis, sendo esse número três vezes maior do que o reportado para o mesmo período em 2018 (Ministério da Saúde do Brasil, 2019). A rápida expansão dos DENVs pelo país, assim como por outras áreas de clima tropical, ocorre devido à excelente capacidade de vetorização do vírus por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (4). Diversas ferramentas para o controle do vetor estão disponíveis ou em desenvolvimento, tais como uso de larvicidas e mosquitos geneticamente modificados, que embora representem uma importante estratégia para o controle de arboviroses, requerem planejamento e intensa participação social (9).

O vírus Dengue é uma partícula esférica, envelopada, com simetria icosaédrica e diâmetro de aproximadamente 40-50 nm (figura 1 A). O DENV possui como genoma uma molécula de RNA (~11Kb) de fita simples e orientação positiva, responsável por codificar apenas uma poliproteína que, após clivagem proteolítica, dá origem a três proteínas estruturais componentes da partícula viral: a proteína do envelope (E), a precursora de membrana (prM) e a do capsídeo (C). Após a clivagem, são formadas também sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) relacionadas com a evasão à resposta imune, replicação e patogênese viral (figura 1 B) (10). A identidade compartilhada do genoma entre os sorotipos é de aproximadamente 65% (2,11). A diversidade de sorotipos e genótipos do vírus Dengue está associada às pressões seletivas do meio ambiente e ao próprio sistema imunológico do hospedeiro (12). Essas divergências genéticas refletem-se no *fitness* viral, virulência e potencial epidêmico, logo o monitoramento específico de cada um dos sorotipos, apesar de complexo, mostra-se importante para o planejamento das ações de saúde pública (13).

A infecção pelo vírus Dengue pode apresentar-se de forma assintomática (75 % dos casos), febril ou mesmo como doença grave (14). Ainda não existe tratamento específico para a dengue, estando o mesmo limitado ao suporte terapêutico voltado apenas à redução dos sintomas que incluem, além da febre, dores de cabeça e retro-orbital, artralgias, mialgia, linfadenopatia e erupções cutâneas. As manifestações mais graves da dengue, que abrangem os distúrbios hemorrágicos como sangramentos de mucosa e gastrointestinal, estão associadas às infecções secundárias pelo DENV, dependem da idade e sexo dos indivíduos, bem como do sorotipo do vírus circulante (2,14). Sabe-se ainda que infecções secundárias, em especial, por um sorotipo diferente estão relacionadas com doença severa e fazem da avaliação clínica e diagnóstico pontos importantes na assistência ao paciente (15).

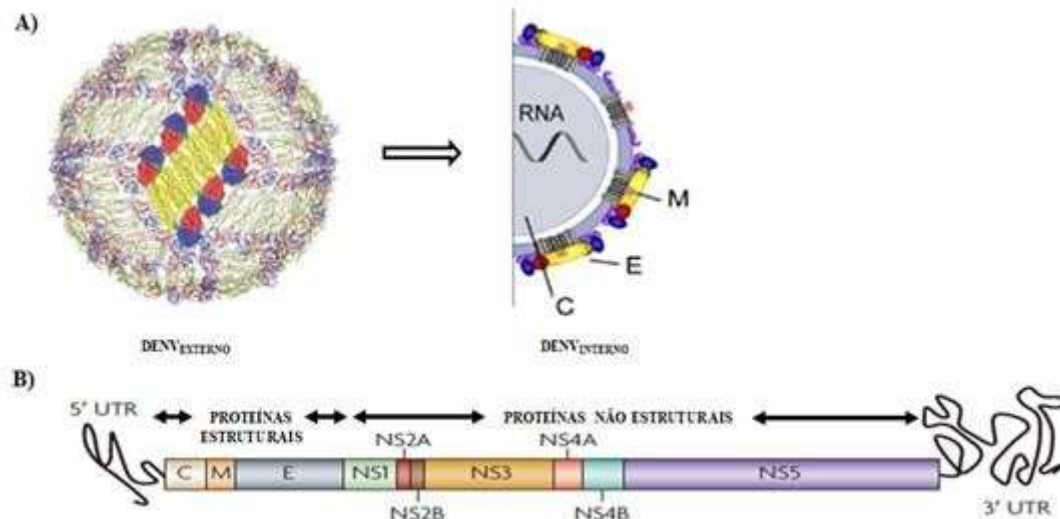


Figura 1 - O vírus Dengue: representação da partícula e do genoma viral. O DENV expressa uma poliproteína que dá origem às proteínas estruturais e não estruturais do vírus, após a clivagem proteolítica. Descrição: (A) Representações esquemáticas da partícula viral, evidenciando a estrutura dimérica da proteína E, o capsídeo viral C, a proteína M e o genoma (RNA). (B) Estrutura do RNA fita simples, em destaque os genes que codificam as proteínas estruturais (C, M e E), não estruturais (NS1-5) e as regiões UTR (regiões não traduzidas). Adaptado de Mukhopadhyay et. al., 2005 e Guzman et. al., 2010; Heinz Stiasny, 2012 (2,3,16).

1.2 O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DENGUE

O diagnóstico laboratorial da dengue representa uma importante alternativa ao diagnóstico clínico, que é de grande dificuldade, pois as manifestações clínicas da dengue são semelhantes à hepatite, malária, leptospirose e outras doenças tropicais, particularmente, arboviroses como zika e chikungunya (1,17). Portanto o diagnóstico laboratorial específico da doença é relevante, visto que permite a confirmação dos casos suspeitos de dengue, sendo essencial para avaliar o prognóstico dos pacientes com precisão, evitando a progressão da doença para manifestações de maior gravidade. Os testes laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da dengue são realizados por métodos diretos, que envolvem a detecção do vírus ou antígenos virais e por metodologias indiretas fundamentadas, principalmente, nos ensaios sorológicos para detecção dos biomarcadores da infecção (18).

Os métodos de diagnóstico direto da dengue envolvem o isolamento viral, detecção do genoma e antígenos virais, particularmente, a proteína Não Estrutural 1 (NS1). Esses métodos são utilizados, principalmente, durante a fase aguda da infecção, e são caracterizados pela elevada especificidade. No entanto, apresentam reduzido poder de diagnóstico, visto que são aplicáveis apenas no período de viremia, que dura, aproximadamente, 10 dias após a infecção

(figura 2) (18). A NS1 é secretada no início da infecção e por isso amplamente utilizada como biomarcador, sendo a detecção feita por testes rápidos e ensaios de ELISA (19). O isolamento viral, considerado o teste padrão ouro no diagnóstico da dengue, e a detecção do RNA viral possuem ainda como vantagem a capacidade de identificar o sorotipo do DENV. Mas é importante destacar que essas técnicas possuem limitações, como o curto período de circulação do vírus na corrente sanguínea, o custo elevado, a necessidade de pessoal treinado e infraestrutura laboratorial complexa, por isso a Organização Mundial de Saúde recomenda o uso deles, especialmente, por centros de referência (4,18)

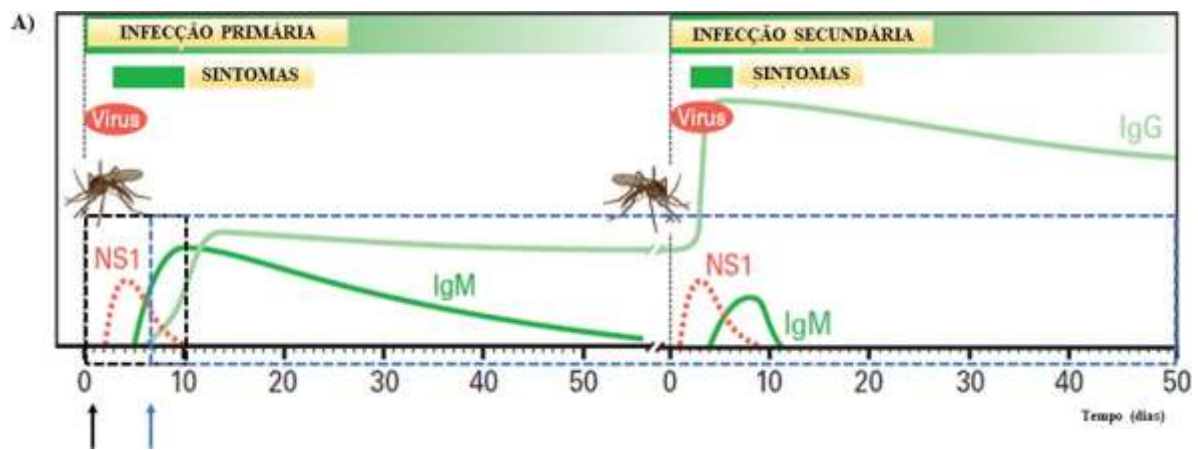


Figura 2 - A dinâmica da infecção e o diagnóstico da dengue. O entendimento da evolução clínica da dengue é importante para o planejamento e execução dos testes de diagnóstico da dengue. A dinâmica da infecção envolve a circulação da NS1 e das imunoglobulinas IgM e IgG. Descrição: (A) Representações esquemáticas da evolução das infecções primária e secundária pelo vírus Dengue, em destaque o período de circulação da proteína Não Estrutural 1 (NS1), a viremia e a produção da imunoglobulinas IgM e IgG. A seta e região em destaque (cor preta) demarcam o período para execução dos métodos diretos, as regiões demarcadas em azul correspondem ao período ideal de aplicação dos métodos indiretos de diagnóstico. Adaptado de *Euroimmun Brasil* e disponível em: <<http://www.denguevirus.com.br/>> (acesso em 06/05/2019).

Nesse sentido os métodos indiretos de diagnóstico, baseados na detecção de anticorpos IgG e IgM, aparecem como uma alternativa promissora. Os testes sorológicos para a detecção de anticorpos, como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), os testes imunocromatográficos e HI (inibição da hemaglutinação) podem ser utilizados em centros primários de atenção à saúde e/ou centros regionais (2). Esses testes possuem como vantagens o custo mais acessível, a facilidade e rapidez na execução (17). Além disso, os métodos indiretos possuem maior sensibilidade, visto que a detecção de anticorpos é possível desde a fase aguda da infecção (figura 2) (1). Apesar disso, o diagnóstico sorológico da dengue segue sendo

desafiador devido à reatividade cruzada dos anticorpos com outros flavivírus, particularmente o ZIKV, o que compromete a especificidade dos testes comerciais disponíveis (1,18).

A infecção pelo DENV é responsável pelo desenvolvimento de resposta de anticorpos de longa duração que, como descrito previamente, funcionam como biomarcadores de exposição ao vírus (20,21). Durante a infecção os anticorpos IgM aparecem 4 dias após os sintomas iniciais, e ao final da primeira semana de infecção é possível detectar IgG, cujos níveis aumentam ao longo da infecção, sendo observados títulos elevados, principalmente, em infecções secundárias (18). A maioria dos anticorpos são direcionados contra proteínas estruturais (E e prM) e contra a NS1. Além disso, menores níveis de anticorpos já foram detectados contra outras proteínas não estruturais, como a NS3 e a NS5 (20,22,23). Visto que a maioria dos anticorpos são direcionados contra a proteína E, muitos testes sorológicos são fundamentados na presença desse antígeno para detecção de anticorpos e por isso utilizam a proteína E recombinante, partículas virais inativadas e VLPs (*Virus Like Particles*) (21,23). No entanto, sabe-se que os anticorpos contra a proteína E são, predominantemente, direcionados contra o Domínio II dessa proteína (região do *loop* de fusão) que contém epítomos conservados entre os flavivírus (20). Como consequência, muitos dos testes de diagnóstico, baseados na proteína E, apresentam reatividade cruzada entre os flavivírus.

A plataforma de ELISA tem sido tradicionalmente utilizada, desde a década de 80, para detecção de anticorpos ou antígenos do vírus Dengue (17). Os testes de ELISA são de execução simples, baixo custo e possibilitam a avaliação de grande número de amostra (25). No Brasil todos os laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública empregam essa plataforma. Atualmente, o ensaio de ELISA para captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) é amplamente utilizado, sendo inclusive o teste sorológico de escolha para diagnóstico da dengue no Brasil (Ministério da Saúde, 2009). O MAC-ELISA tem como princípio a detecção de anticorpos IgM utilizando antígenos virais de células infectadas pelos DENVs, apresentando sensibilidade e especificidade de 90 e 98 %, respectivamente (2). O Ministério da Saúde do Brasil recomenda também testes sorológicos para detecção de IgG, embora existam apenas 6 testes na plataforma de ELISA registrados na ANVISA com essa finalidade (tabela 1, em destaque).

O diagnóstico de infecções prévias por cada um dos sorotipos do DENV (detecção de IgG) poderia ser de grande impacto na saúde pública, pois permite o monitoramento epidemiológico (incidência e prevalência da doença), identificação dos indivíduos que soroconvertem após vacinação, permitindo também avaliar fatores de risco para doença grave,

pois infecções secundárias pelo DENV podem evoluir para dengue grave (4,18,27). No entanto, os ensaios sorológicos comerciais para diagnóstico da dengue possuem sensibilidade variável e especificidade limitada (28). Além disso, não existem testes sorológicos comerciais para determinação de sorotipos dos DENVs na plataforma de ELISA. O desenvolvimento de novos testes sorológicos que possam efetivamente identificar o sorotipo de DENV com elevado grau de confiabilidade é essencial para que ferramentas inovadoras possam ser empregadas no combate à dengue, permitindo uma melhor avaliação do prognóstico e uma maior acurácia nas intervenções clínicas. Portanto, é essencial desenvolver novos antígenos que permitam o aprimoramento das plataformas atuais de diagnóstico.

Tabela 1: Testes comerciais registrados no Brasil para diagnóstico da dengue^{1,4}

TESTE DE DIAGNÓSTICO ²	PRINCÍPIO DO TESTE ³
Dengue Duo teste rápido	Teste imunocromatográfico para detecção IgG, IgM e NS1. Contém anticorpo monoclonal capaz de capturar a NS1 e antígeno específico do dengue que é reconhecido pelas imunoglobulinas.
Alere dengue IgG e IgM	Informações não encontradas.
Panbio IgG ELISA	
Alere dengue Duo NS1, IgG e IgM	
Teste rápido OneSite dengue Ag IgG/IgM	Teste imunocromatográfico que utiliza antígenos recombinantes capazes de serem reconhecidos por IgG e IgM do soro teste, e anticorpos monoclonais que capturam a NS1.
Teste rápido OneSite Duo dengue IgG/IgM Combo	Teste imunocromatográfico que utiliza antígenos recombinantes do envelope viral capazes de serem reconhecidos por IgG e IgM.
Platelia Dengue IgG Capture	Teste de ELISA baseado na captura de anticorpos IgG utilizando α -IgG humano, antígeno NS1 e anticorpo monoclonal α -NS1 conjugado à peroxidase.
VISITECT Dengue	Teste imunocromatográfico que utiliza antígenos recombinantes do envelope viral capazes de serem reconhecidos por IgG e IgM.
Novagnost Dengue IgG	Teste de ELISA indireto baseado em antígenos específicos do vírus Dengue para detecção de IgG.
Humanasis teste de anticorpos IgG/IgM Dengue	Informações não encontradas.
Dengue IgG e IgM	Teste imunocromatográfico para captura de IgG e IgM utilizando antígenos do DENV.
Anti-Dengue vírus ELISA IgG Euroimmun	Teste de ELISA para detecção de anticorpos IgG contra partículas do vírus Dengue 2 purificadas.
Dengue IgG/IgM	Informações não encontradas.
Dengue IgG/IgM ECOtest Dengue IgG/IgM Premium	Teste imunocromatográfico para detecção de IgG e IgM que reagem com a proteína E recombinante presente no teste.
ECO Teste ECO F Dengue IgG/IgM	
Teste rápido Dengue IgG/IgM	Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgG e IgM capturados por antígenos específicos do vírus Dengue.
Dengue-EIC IgG/IgM	Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgG e IgM que reconhecem os antígenos recombinantes do envelope viral presente no teste (DEN 1-4).
Dengue IgM/IgG	Teste imunocromatográfico para detecção de IgG e IgM que são reconhecidos por antígenos recombinantes da proteína do Envelope do DENV.
LUMIRATEK DENGUE IgG/IgM - CASSETE	Informações não encontradas.
Dengue IgG/IgM imunocromatografia	Teste imunocromatográfico em que os anticorpos IgG e IgM (anti-DENV), reagem com antígenos específicos do vírus Dengue.

Dengue vírus IgG DxSelect	Teste de ELISA para detecção qualitativa de anticorpos IgG utilizando antígenos inativados dos DENVs 1-4.
Teste rápido dengue Ag e Ab Combo	Teste imunocromatográfico para detecção dos anticorpos IgG/IgM e do antígeno NS1.
OL Combo Dengue NS1/IgG/IgM	Teste imunocromatográfico para detecção de antígenos e ou anticorpos contra arbovírus.
OL Dengue IgG/IgM	
OL Combo Chikungunya – Dengue IgG/IgM	
Dengue BIO	Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgG e IgM específicos a antígenos do vírus Dengue presente no ensaio.
INNOVITA DENGUE IgG/IgM	Informações não encontradas.
Serion ELISA classic Dengue vírus IgG/IgM	ELISA para detecção de anticorpos IgG contra antígenos específicos do DENV.
Smart test anti Dengue IgM/IgG SYM	Informações não encontradas.
Dengue IgG/IgM	Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos específicos ao dengue que reagem com antígenos recombinantes do envelope viral.
Imuno rápido Dengue IgG/IgM	Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos específicos a antígenos recombinantes do envelope viral.
BioPix DENGUE IgG/IgM	

1- Identificados os testes comerciais para detecção de anticorpos IgG, foram catalogados também os *kits* que detectavam simultaneamente IgG, IgM e NS1.

2- Os produtos foram consultados na Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), foram catalogados apenas os que estão com registro válido. Data de pesquisa 05/01/2019.

3- Informação disponível nos guias de cada *Kit*, assim como nos *sites* oficiais dos fabricantes/distribuidores.

4- Destaque para os testes que utilizam a plataforma de ELISA.

1.3 A PROTEÍNA NS1 E O DIAGNÓSTICO DA DENGUE

A NS1 é uma glicoproteína (~46-50kDa), expressa por todos os flavivírus durante a infecção, encontrando-se nas conformações monomérica, dimérica, e a hexamérica (30). Ainda é incerta a função dessa proteína, porém acredita-se que participe como um arcabouço estrutural no complexo de replicação do genoma viral e esteja relacionada com a evasão da resposta imune do hospedeiro, por bloqueio da ação de proteínas do complemento (31). O principal obstáculo ao uso da NS1 em testes de diagnóstico deve-se ao fato dessa proteína possuir sítios de cisteínas conservados entre os flavivírus, reduzindo a especificidade dos ensaios (30). Os flavivírus compartilham elevada homologia de sequência do gene que codifica a NS1 (29), entre a proteína do ZIKV e dos DENVs 1-4 a homologia varia entre 51 e 53 %. Dentre os sorotipos do DENV essa porcentagem é variável, o maior compartilhamento de informação genética é de 81 % entre os DENVs 1 e 3, já o DENV 4 destaca-se como o mais distante entre os sorotipos, variando de 71-75 % (32). No entanto, fragmentos da proteína possuem homologia de sequência variável entre os sorotipos, tais como a região C-terminal, na qual a homologia varia entre 74-85 % para a NS1 dos DENVs 1-4, portanto de interesse na identificação de novos antígenos alvos no diagnóstico.

A NS1 consiste em um dos principais alvos no diagnóstico da dengue, a detecção desse antígeno por ELISA ou teste imunocromatográfico funciona como uma excelente estratégia de diagnóstico durante a fase aguda da dengue (15). Grupos de pesquisa têm desenvolvido novos ensaios para captura da NS1, fundamentados na utilização de anticorpos monoclonais anti-NS1. Os trabalhos publicados recentemente mostram que essa estratégia permite a diferenciação entre espécies de vírus da família *Flaviviridae*, e até mesmo a identificação de sorotipos do DENV (33). Logo, é sugestivo de que a NS1 possui epítomos específicos ao DENV, assim como a cada um dos sorotipos (34). A NS1 é encontrada em elevadas concentrações na corrente sanguínea, é altamente imunogênica e responsável por promover uma resposta humoral (23,34). Nesse sentido, a detecção de anticorpos (anti-NS1) aparece como estratégia de grande interesse. O Instituto Pasteur de Paris desenvolveu teste de ELISA para detecção de anti-NS1 IgG com a finalidade de avaliar a exposição prévia ao DENV em indivíduos que receberam a vacina desenvolvida no instituto (22). Além disso, grupos têm utilizado também a combinação da NS1 dos DENVs para diagnóstico específico de infecções prévias pelo vírus (22,24). No entanto, a utilização da NS1 inteira nos testes precisa ser

reavaliada diante da reemergência e circulação de outras arboviroses, particularmente o ZIKV.

1.4 IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO

É difícil mensurar os custos da dengue à economia mundial, embora se avalie que seja de 8,9 bilhões de dólares com os casos sintomáticos (6). Os investimentos governamentais são direcionados, principalmente, para métodos de controle do vetor, atividades e programas educacionais e cuidados hospitalares (7). O desenvolvimento de estratégias de diagnóstico é visto como prioridade pela comunidade científica. Essa emergência está relacionada à atual situação epidemiológica dos países em regiões tropicais, onde há circulação do DENV com outros flavivírus como o ZIKV e o YFV, comprometendo fortemente a especificidade dos testes de diagnóstico disponíveis. Devido a atual situação epidemiológica dos países em regiões tropicais, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) tem recomendado o desenvolvimento de novos procedimentos para o diagnóstico dessas arboviroses (2).

Nessa direção, o Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas identificou e produziu um novo antígeno recombinante baseado na proteína NS1 do ZIKV (Δ NS1 ZIKV), para o diagnóstico específico de infecções prévias pelo vírus Zika. A identificação do antígeno permitiu a obtenção de pedido de proteção intelectual ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (BR102016011318-0) e a validação do teste de diagnóstico sorológico em parceria com laboratórios do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e do Instituto Butantan. Nesta nova proposta, a obtenção dos segmentos derivados das proteínas NS1 dos DENVs 1-4, e que correspondem aos fragmentos homólogos à NS1 ZIKV descrito anteriormente, abrem perspectivas para o estabelecimento do diagnóstico específico da dengue e adequada sorotipagem.

Nos últimos anos tem-se investido em diferentes métodos como os biossensores e alternativas empregando nanotecnologia (17). Mas é preciso investir também em plataformas tradicionais como os testes de ELISA, amplamente validados e aceitos por laboratórios de saúde pública. Além disso, é indispensável identificar novos antígenos que promovam melhores valores de sensibilidade e especificidade. Nesse sentido, a presente proposta apresenta-se de forma inovadora e contribui para o desenvolvimento de estratégias de testes sorológicos, ao investigar o uso de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico da dengue.

2 OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar estratégias de diagnóstico sorológico específico da dengue, baseadas nas proteínas Δ NS1 dos DENVs 1-4, que sejam capazes de diferenciar a infecção prévia pelos quatro sorotipos do DENV. Com essa finalidade, foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- 1) Expressar as proteínas recombinantes Δ NS1 dos DENVs em sistema procarioto, utilizando linhagens comerciais de *Escherichia coli*, e purificá-las por meio de técnicas cromatográficas, obtendo-as na forma solúvel;
- 2) Avaliar a antigenicidade e imunogenicidade das proteínas purificadas;
- 3) Examinar o potencial das proteínas Δ NS1 dos DENVs 1-4 combinadas para o diagnóstico específico da dengue em plataforma de ELISA;
- 4) Investigar o uso das Δ NS1 de cada um dos DENVs para identificação de infecção prévia por cada um dos sorotipos.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Δ NS1 DOS DENVs 1-4

3.1.1 DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Δ NS1 DOS DENVs

As proteínas recombinantes Δ NS1 de cada um dos sorotipos do DENV utilizadas neste trabalho correspondem ao fragmento C-terminal da proteína NS1 dos DENVs. As sequências correspondentes às proteínas NS1 inteira de cada um dos sorotipos que deram origem às proteínas recombinantes estão disponíveis em bancos de dados públicos e os códigos de acesso são: AHF50491 (DENV1), CAA78918 (DENV2), AFN80339 (DENV3) e AEX09561 (DENV4). As sequências recombinantes foram baseadas na proteína Δ NS1 do ZIKV, que foi utilizada como antígeno em ensaio sorológico específico ao ZIKV e sob patente depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (BR102016011318-0).

A caracterização inicial das sequências foi realizada utilizando ferramentas *online* de bioinformática. As sequências de aminoácidos das proteínas foram alinhadas e a identidade determinada utilizando o algoritmo Clustal Omega. A análise de superfície das proteínas para identificação de sítios hidrofílicos foi feita com ferramentas de predição disponíveis no IEDB (*Immune Epitope Database and Analysis Resource*). A predição foi baseada na localização de epítomos contínuos, seguida da predição de hidrofobicidade de Parker (37). A estrutura das proteínas foi determinada com auxílio do servidor I-TASSER (*Protein Structure and Function Prediction*) e a identificação de epítomos conformacionais de células B no CBTOPE (*Conformational B-cell Epitope Prediction*) (38).

3.1.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Δ NS1 DOS DENVs (1, 2, 3 E 4)

Os genes para a expressão das proteínas recombinantes foram obtidos comercialmente (*GenScript*), subclonados em vetor comercial de expressão pET28a (Novagen), flanqueados com sítios para as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI* (Fermentas) e contendo marcador de resistência ao antibiótico canamicina (figura 3 A). As proteínas foram fusionadas à caudas de histidina (*HisTag*) nas regiões C e N-terminal das proteínas, possibilitando a utilização de técnicas cromatográficas para sua purificação e imunodeteção com anticorpos monoclonais (*anti-HisTag*).

A confirmação da obtenção dos genes de interesse foi realizada por análise de dupla restrição com as enzimas que flanqueiam cada um dos genes de interesse, e o produto da reação foi analisado em gel de agarose 0,8 % (m/v).

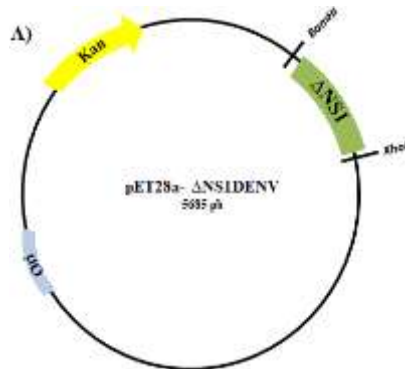


Figura 3 - Vetores de expressão das proteínas Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4) – A região C-terminal da proteína NS1 de cada um dos sorotipos de dengue foi subclonada em vetor comercial pET28a, obtendo os vetores de expressão pET28a- Δ NS1 (dos vírus Dengue 1, 2, 3 e 4). Descrição: (A) o esquema do vetor de expressão das proteínas recombinantes, onde Kan representa o marcador de resistência (canamicina) e Ori a origem de replicação.

3.1.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVS (1, 2, 3 E 4)

As proteínas recombinantes foram expressas em modelo procarioto, utilizando *Escherichia coli* (*E. coli*) quimiocompetente. As linhagens de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) *ArticExpress* e BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) foram transformadas por choque térmico com 100 ng do vetor de expressão das proteínas Δ NS1. As células bacterianas, após adição do vetor de expressão, foram incubadas a 0 °C, por 5 minutos, seguido de incubação a 42 °C por 2 minutos, finalizando com incubação a 0 °C por mais 5 minutos. As células transformadas foram recuperadas em meio LB (Luria Bertani), a 37 °C em agitação suave e por 1 hora. Os transformantes de cada uma das linhagens bacterianas foram selecionados e cultivados em 5 ml de meio LB suplementado com o antibiótico canamicina (50 μ g/ μ l). Para o cultivo dos transformantes na linhagem *ArticExpress* utilizou-se também a gentamicina (20 μ g/ μ l). Os inóculos foram mantidos a 37 °C, 220 rpm, até atingirem DO₆₀₀ equivalente a 2. Ao atingirem a DO₆₀₀ esperada, as culturas foram induzidas em meio LB com 0,5 mM de IPTG, a 18 °C, 200 rpm e por um período de 18h. Alíquotas antes da indução (T0) e após indução (T18) foram coletadas e normalizadas para a mesma quantidade de células, sendo posteriormente centrifugadas a 8000 rpm, por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 50 μ l de tampão de amostra (tabela 2). A expressão das proteínas de interesse foi avaliada por análise eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15 % em condições desnaturantes, assim como por imunoenensaio de *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal *anti-HisTag* (Sigma Aldrich).

A avaliação da solubilidade das proteínas de interesse foi verificada apenas com a linhagem bacteriana que melhor expressou as proteínas. Os transformantes foram cultivados em 50 mL de meio LB contendo 50 µg/µl de canamicina, sendo mantidos em duas condições: I) a 37 °C, 220 rpm, até atingir DO₆₀₀ de 2; II) a 37 °C, 220 rpm, até atingir DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. As culturas, que atingiram DO₆₀₀ de 2, foram induzidas com 0,25 mM e 0,5 mM de IPTG, a 18 °C, 200 rpm e por 18h. As culturas, que mantiveram DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8, foram induzidas com 0,5 mM de IPTG, a 37 °C, 200 rpm, por 2h e 3h. Ao final da indução, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante descartado, o *pellet* ressuspendido e homogeneizado em 15 mL de tampão de lise (tabela 2). O extrato bacteriano foi lisado em aparelho sonicador (Branson), com pulso ativo de 30 segundos, pausa de 1 minuto, com amplitude de 30 % e por 3 ciclos. Após a lise as amostras foram novamente centrifugadas (10.000 rpm, por 30 minutos e 4 °C) para obtenção das frações solúvel (FS) e insolúvel (FI). O *pellet* contendo a fração insolúvel foi ressuspendido em 15 ml de tampão C (tabela 2), homogeneizado e centrifugado, para recuperação do sobrenadante, a 10.000 rpm, por 30 minutos e 4 °C. Alíquotas, com volumes equivalentes, antes e após indução, assim como das frações solúvel e insolúvel, após solubilização em tampão C, foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%.

3.1.4 EXPRESSÃO EM MAIOR ESCALA, REFOLDING E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ΔNSI DOS DENVS (1, 2, 3 E 4)

Para expressão das proteínas em maior escala foi realizado pré-inóculo com os transformantes que expressam as proteínas de interesse em 50 mL de meio LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina, a 37 °C e *overnight*. As culturas obtidas foram transferidas (1:100) para 750 mL de meio de cultura TB (*TerrificBroth*) suplementado com 50 µg/µl de canamicina, as culturas foram mantidas a 220 rpm, 37 °C, até que atingissem DO₆₀₀ igual a 2. A indução foi feita com 0,5 mM de IPTG, a 18 °C, 200 rpm e por um período de 18 horas. A massa celular induzida foi obtida por centrifugação a 10.000 rpm, por 10 minutos, sendo posteriormente ressuspendida em tampão de lise (contendo inibidor de proteases PMSF, *phenylmethylsulfonyl fluoride*) até que se obtivesse uma solução homogênea. As amostras foram submetidas à lise mecânica em homogeneizador modelo APLAB-10 (ARTEPEÇAS). Os extratos proteicos obtidos após a lise foram centrifugados a 10.000 rpm, por 50 minutos e 4 °C, sendo o sobrenadante descartado. Os *pellets* contendo as proteínas de interesse na fração

insolúvel foram ressuspendidos em 35 mL de tampão C e homogeneizados *overnight*. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm, por 30 minutos e temperatura de 4 °C, sendo o sobrenadante recolhido para posterior renaturação. As proteínas foram solubilizadas em processo de *refolding* utilizando o método de diluição pulsátil, no qual as amostras foram solubilizadas em 2 L de tampão A (tabela 2) sob agitação constante, de acordo com protocolo descrito por Amorim e colaboradores (39). Os experimentos de *refolding* e purificação foram precedidos de uma curva salina (150 mM NaCl, 300 mM NaCl e 500 mM NaCl) com os tampões A e B descritos na tabela 2, para definir as melhores condições de renaturação e purificação.

As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), utilizando o sistema AKTA AVANT (GE Healthcare Life Sciences). As amostras obtidas após *refolding* foram clarificadas por centrifugação a 10.000 rpm, 50 minutos e 4 °C, seguida de filtração em membranas de nitrocelulose de 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech). Para a purificação utilizou-se colunas HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibradas com cinco volumes de coluna de tampão A. As amostras foram injetadas em fluxo de aproximadamente 2,5 ml/min e o *flowthrough* coletado para análise. As proteínas foram eluídas em gradiente crescente do tampão B (tabela 2), associado a um *step* inicial com 2 % do mesmo tampão para remoção de possíveis contaminantes, todo o processo foi acompanhado pelo monitoramento da luz ultravioleta (mAU), em comprimento de onda de 280 nm. As proteínas purificadas foram submetidas a imunoensaio de *Western blotting* e eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15 % para determinar o grau de pureza, quantificação e rendimento.

Tabela 2 - Tampões para expressão, *refolding* e purificação das proteínas Δ NS1 dos vírus Dengue

TAMPÃO	COMPOSIÇÃO
Tampão de amostra	200 mM Tris-HCL pH 6,8, 8% SDS (m/v), Glicerol 40% (v/v), azul de bromofenol 0,4% (m/v), 200 mM 2- β -mercaptoetanol
Tampão de lise	100 mM Tris, 0,5 M NaCl, 20% de glicerol, pH 8,5
Tampão C	100 mM Tris, 0,5 M de NaCl, 8 M Uréia, pH 8,5
Tampão A	10 mM Bis Tris Propano, 150 mM NaCl, pH 8,5* ¹
	10 mM Bis Tris Propano, 300 mM NaCl, pH 8,5* ²
	10 mM Bis Tris Propano, 500 mM NaCl, pH 8,5*
Tampão B	10 mM Bis Tris Propano, 150 mM NaCl, 1 M de Imidazol, pH 8,5* ¹
	10 mM Bis Tris Propano, 300 mM NaCl, 1 M de Imidazol, pH 8,5* ²
	10 mM Bis Tris Propano, 500 mM NaCl, 1 M de Imidazol, pH 8,5*
Tampão carbonato	0,29 g de NaHCO ₃ , 0,158 g de Na ₂ CO ₃ , q.s.p 100 mL de água destilada, pH 9,6

*Tampões utilizados na curva salina do *refolding* e purificação dos antígenos de interesse;

¹ Tampão utilizado (melhor condição) no *refolding* e purificação da proteína Δ NS1 DENV3;

² Tampão utilizado (melhor condição) no *refolding* e purificação das proteínas Δ NS1 dos DENVs 1, 2 e 4.

3.1.5 IMUNODETECÇÃO POR ENSAIO DE WESTERN BLOTTING

A expressão e purificação dos antígenos recombinantes foram confirmadas por imunoenensaio de *Western blotting*. Inicialmente alíquotas antes e após indução, assim como o *pool* das proteínas purificadas foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15 % em condições desnaturantes. Na sequência, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,45 μ m (Sigma), em processo de transferência úmida utilizando cuba eletroforética. As membranas foram bloqueadas *overnight* em solução de leite desnatado (5 %, m/v) em 1X Salina Tamponada Fosfatada (PBS) – Tween 0,05 %. A marcação primária foi realizada com anticorpo comercial *anti-HisTag* (Sigma, IgG *mouse*) na diluição 1:3000, capaz de reconhecer a cauda de histidina presente nas proteínas ou com soro murino policlonal α -DENVs 1-4 (diluídos 1:500), por 1 hora. Durante a marcação a membrana foi mantida em agitação suave e à temperatura ambiente. Em seguida ao período de incubação, as membranas foram lavadas três vezes com solução de 1X PBS-Tween 0,05 %. Após a lavagem, as membranas foram incubadas, nas mesmas condições descritas para a marcação primária, com o anticorpo secundário comercial capaz de reconhecer a imunoglobulina G de camundongos e conjugado à enzima peroxidase na diluição de 1:5000 (*goat anti-IgG mouse*, Sigma). As membranas foram lavadas novamente e reveladas por método quimioluminescente de acordo com recomendações do

fabricante (Pircie, ThermoFisher). Após adição dos substratos comerciais (luminol e peróxido) para revelação as membranas foram visualizadas em aparelho fotodocumentador (Bio-rad).

3.1.6 IMUNODETECÇÃO POR ENSAIO DE DOT BLOT

O ensaio de *Dot blot* foi utilizado para avaliar a antigenicidade das proteínas recombinantes purificadas, em sua conformação íntegra ou desnaturadas termicamente (100 °C, por 10 minutos). Amostras das proteínas Δ NS1 de aproximadamente 2 μ g foram utilizadas para sensibilizar membranas de nitrocelulose (Sigma), e utilizou-se como controle negativo a proteína recombinante Stx (toxina de Shiga). As membranas foram bloqueadas com solução 3 % (m/v) de leite, *overnight*. A marcação das membranas foi feita de forma semelhante ao descrito no item 3.1.5. Utilizou-se como anticorpo primário soro policlonal α -DENVs 1-4 (diluição 1:500) e anticorpo secundário comercial anti-IgG diluição 1:5000 (*goat anti-IgG mouse*, Sigma). As membranas foram reveladas com *kit* comercial (Pircie, ThermoFisher), seguindo as recomendações do fabricante e visualizadas em aparelho fotodocumentador (Bio-rad).

3.1.7 ELISA DE ANTIGENICIDADE

A antigenicidade das proteínas purificadas foi avaliada também por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) utilizando 200 ng/poço dos antígenos purificados em sua conformação íntegra, e desnaturados termicamente a 100 °C, por 10 minutos. As proteínas nas duas condições descritas foram diluídas em tampão carbonato (tabela 2) e utilizadas para sensibilizar placas de 96 poços (Maxisorb), *overnight*, a 4 °C. As placas foram bloqueadas com solução 3 % de leite desnatado com 0,5 % de Albumina do Soro Bovino (BSA) em 1X PBS-Tween 0,05 %, sendo mantidas a 37 °C, por um período de 2 horas. Após o bloqueio, as placas foram lavadas com 1X PBS-Tween 0,05 %, e na sequência adicionou-se o soro α -DENVs 1-4, sendo posteriormente diluído em série 1:2. As placas foram novamente lavadas com 1X PBS-Tween 0,05 % e na sequência adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG diluição 1:5000 (*goat anti-IgG mouse*, Sigma). Procedeu-se com nova etapa de lavagem e incubação com solução reveladora (tampão citrato fosfato pH 5,8; OPD (*o*-Phenylenediamine) e H₂O₂), por 15 minutos e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico 2 N (H₂SO₄) e a absorbância mensurada a 492 nm em leitor de placa (Epoch).

3.1.8 IMUNOGENICIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Camundongos da linhagem BALB/c machos com idade de 6 a 8 semanas. Os animais foram imunizados por via subcutânea, em um regime de 3 doses com intervalo de 15 dias, com 10 µg da proteína recombinante (Δ NS1 dos DENVs 1, 2, 3 e 4), associado com 1 µg do imunomodulador LT1 (toxina termolábil 1 de *E. coli*) disponível no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas. As coletas de sangue foram feitas por punção do plexo submandibular e processadas em três etapas para obtenção do soro: incubação a 37°C por 15 min., seguido de incubação a 4 °C por 30 min., finalizando com centrifugação a 3000 g por 30 min., 4 °C. Os experimentos que envolveram a manipulação animal foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e aprovados pelo comitê de ética animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (processo nº 33/2017).

Os títulos de anticorpos IgG específicos, obtidos após protocolo de imunização, foram determinados por ELISA, empregando-se as proteínas recombinantes (protocolo 3.1.7). O soro obtido após a terceira dose com a proteína Δ NS1-DENV 4, foi utilizado em ensaio de citometria para avaliar o reconhecimento da proteína NS1 nativa. Para o ensaio, a linhagem de célula Vero foi plaqueada (1×10^5 células /poço) em meio MEM (Meio Mínimo Essencial de Eagle, Vitrocell) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino, e mantidas a 37 °C e 5 % CO₂. Posteriormente as células foram infectadas com o DENV4, utilizando uma MOI 2 (Multiplicidade de Infecção) e por um período de 24 horas. Após infecção, o sobrenadante foi removido por aspiração e as células lavadas com solução de PBS 1X. Em seguida as células foram tripsinizadas (Tripsina/EDTA 2,5 g/L, Vitrocell) e transferidas para placa em fundo V, sendo centrifugadas a 750 g, 5 minutos e 4 °C (em todas as etapas de lavagem das células). As células foram lavadas (duas vezes) com solução de PBS 1X com 5 % de SFB. As células foram fixadas com 50 µl cytofix (BD Biosciences, Cytofix/Cytoperm), por 15 minutos e ao abrigo da luz. Após incubação, as células foram lavadas (2 vezes) com 50 µl de Cytoperm (BD Biosciences, Cytofix/Cytoperm). A marcação primária foi feita com os anticorpos α - Δ NS1-DENV4 (diluição de 1:1300) ou com anticorpo monoclonal 4G2, utilizado como controle positivo da infecção, sendo capaz de reconhecer as partículas virais (0,5 µg/poço). Na sequência, as células foram lavadas (2 vezes) com 50 µl da solução de Cytoperm. A marcação secundária foi feita com anticorpo anti-IgG *mouse* Alexa 488 (ThermoFisher, diluição 1:800). Para as marcações, a incubação com os anticorpos foi feita por 30 minutos e

em gelo. Como controle negativo do experimento foram utilizadas células Vero não infectadas, que foram submetidas aos mesmos procedimentos de marcação. Ao final as células foram lavadas com PBS 1X (com 2 % de SFB) e as amostras foram avaliadas por citometria de fluxo BD LSRFortessa (BD Biosciences). Os resultados foram avaliados em *software* FlowJo.

3.1.9 ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ (DLS)

O volume hidrodinâmico (tamanho) e dispersão das proteínas recombinantes purificadas foram determinados por ensaio de DLS, utilizando equipamento Zetasizer Nano-Z (MALVERN), disponível no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O volume correspondente a 1 mL de cada uma das amostras de proteína, em concentrações de 0,22 µg/ul a 0,6 µg/µl, foi previamente centrifugado a 10.000 rpm, 4 °C, 10 minutos. As medições foram realizadas de acordo com o protocolo padrão do equipamento, utilizando solução aquosa como agente dispersante e a temperatura de 25 °C. O tamanho do diâmetro das partículas foi fornecido em nanômetros e corresponde à média aritmética de três medições independentes associadas ao erro padrão.

3.2 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ΔNS1 DENVS 1-4 NO DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DA DENGUE

3.2.1 DETECÇÃO MOLECULAR DOS DENVS E ZIKV

Os lotes virais disponíveis no laboratório, DENV1 (*GeneBank* JX669467), DENV2 (*GeneBank* AHG97599.1), DENV3 (*GeneBank* KC425219), DENV4 (*GeneBank* GU289913.1) e ZIKV (ZIKV^{Br}), foram identificados por testes de biologia molecular, de acordo com protocolo descrito previamente e em colaboração com o Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática no ICB/USP (40). Inicialmente, foi feita a extração do RNA viral, para isso utilizou-se 150 µl de amostra diluída em 150 µl de água ultra-pura, foram adicionados 900 µl de trizol, as amostras foram homogeneizadas e mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos. 240 µl de clorofórmio foram adicionados, seguido de homogeneização e incubação por mais 10 minutos, à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 g, 15 minutos e 4 °C e o sobrenadante (~600 µl) transferido para outro tubo. Foram acrescentados 600 µl de isopropanol, e imediatamente as amostras foram

homogeneizadas e mantidas por 10 minutos, à temperatura ambiente. Foi realizada nova centrifugação a 12000 g, 10 minutos, 4 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi removido e foram adicionados 1000 µl de etanol 75 % gelado, seguido de rápida agitação e nova centrifugação, a 7500 g, 5 minutos e 4 °C. Ao final o sobrenadante foi removido, e o excesso foi seco com papel filtro, em seguida o RNA foi ressuspendido em água ultra-pura. O RNA viral foi submetido à reações subsequentes de RT-PCR (em ciclo de 42 °C por 4 minutos, 95 °C por 5 minutos e 72 °C por 7 minutos) e PCR (em ciclo de 94 °C por 1 minuto, 94 ° por 35 segundos e 72 °C por 7 minutos) em aparelho termociclador, utilizando *primers* específicos a cada um dos vírus e descritos na literatura (41). O produto da amplificação foi avaliado em gel de agarose 1,5 %.

3.2.2 PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE EM MODELO MURINO

Os soros hiperimunes foram produzidos em camundongos de 6 a 8 semanas da linhagem AG129, utilizando os vírus identificados no item 3.2.1. Os animais foram infectados com dose não letal de 10^4 (com os DENVs 1, 3 e 4), $5 \cdot 10^1$ (DENV2), e 10^1 (ZIKV) Unidades Formadoras Placa. O inóculo foi administrado pela via subcutânea em um volume de 50 µl, diluídos em meio MEM (Meio mínimo essencial de *Eagle*, Vitrocell), enquanto no grupo controle foi administrado apenas o meio MEM. Os animais infectados com os DENVs 1, 2 e 4 receberam uma segunda dose do inóculo viral. As coletas de sangue foram feitas por punção do plexo submandibular como descrito no item 3.1.8.

A cinética de anticorpos α - Δ NS1 dos DENVs 1-4 foi avaliada com soros obtidos 1, 7, 21, 30 e 50 dias após a infecção. Além disso, amostras de soro α -DENV2 foi utilizada para avaliar o reconhecimento diferencial entre a proteína NS1-DENV2 (proteína recombinante disponível no laboratório) e o fragmento Δ NS1-DENV2. Para os ensaios de cinética e do reconhecimento diferencial das proteínas utilizou-se o protocolo descrito no item 3.1.7.

3.2.3 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE

A especificidade das proteínas Δ NS1 dos DENVs, íntegras ou desnaturadas termicamente, foi avaliada frente à amostra do soro murino positiva para o ZIKV em ensaio de ELISA como descrito previamente. Para confirmar a especificidade os antígenos foram incubados com quantidades de anticorpos equivalentes, baseado na normalização da absorvância (DO_{492}) do

soro ZIKV frente à proteína Δ NS1 do ZIKV (antígeno recombinante purificado e disponível no laboratório). Para Δ NS1 do DENV3, que apresentou reatividade frente ao soro ZIKV, utilizou-se tratamento com solução de ureia (6 M diluída em PBS 1X e pH 7,4), após a etapa de incubação com anticorpo primário α -ZIKV, por um período de 10 minutos. Uma segunda alternativa de tratamento consistiu na incubação do soro α -ZIKV com a proteína Δ NS1 do ZIKV, previamente à etapa de marcação primária. Após a realização de ambos os tratamentos, procedeu-se com o protocolo de ELISA.

3.2.4 ENSAIO DE ELISA PARA DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DA DENGUE

A plataforma de ELISA foi selecionada para validar o potencial dos antígenos no diagnóstico específico de infecções prévias pelos DENVs, o ensaio empregou o mesmo protocolo descrito no item 3.1.7. No entanto, para sensibilizar as placas utilizou-se a combinação das proteínas Δ NS1 dos quatro sorotipos. A massa dos antígenos/poço foi de 150/100/100/100 ng da mistura das proteínas dos DENVs 1/2/3/4, respectivamente. A marcação primária foi realizada com os soros descritos no item 3.2.4 (diluição 1:200), seguida de incubação com anticorpo secundário α -IgG diluição 1:5000 (*goat anti-IgG mouse*, Sigma). Alternativamente, utilizou-se como anticorpo primário amostra de pacientes infectados pelo DENV2, ZIKV e soro negativo para infecção por arbovírus (diluição 1:100) e anticorpo secundário α -IgG *human* (Sigma, 1:4000). As amostras de soro humano foram obtidas em laboratório colaborador e previamente caracterizadas por ensaio de PRNT. As placas de ELISA foram reveladas sendo determinados os títulos de anticorpos IgG e a absorvância a 492 nm.

3.3 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DENVs 1-4 NA IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS

3.3.1 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE Δ NS1 DENVs 1-4 FRENTE AOS SOROTIPOS DO DENV

A especificidade das Δ NS1 DENVs 1-4 frente a soro murino específico a cada um dos sorotipos foi avaliada de acordo com protocolo semelhante ao descrito no item 3.2.4. Assim como descrito previamente, os soros foram normalizados para a mesma DO (492 nm), baseados na reatividade frente ao antígeno homólogo. O resultado foi representado em título de anticorpos IgG.

3.3.2 ENSAIO DE ELISA PARA IDENTIFICAÇÃO DO SOROTIPO DO VÍRUS DENGUE

A padronização dos ensaios para determinação de infecções prévias por cada um dos sorotipos do DENV também foi feita na plataforma de ELISA. As placas foram sensibilizadas, com 200 ng/poço de cada uma das Δ NS1 DENVs 1-4. A marcação primária foi feita com os soros monoespecíficos a cada um dos DENVs (diluição 1:200) e a marcação secundária com α -IgG *mouse* (diluição 1:5000). As placas foram reveladas e os resultados expressos de acordo com os valores de DO_{492} .

Ensaio de ELISA foram realizados também com a Δ NS1 DENV3 obtida em diferentes condições de purificação, que foram realizadas de forma análoga ao descrito no item 3.1.4. No entanto, utilizou-se tampões A e B contendo 5 mM de β -mercaptoetanol ou 0,5 M de D-glicose (condição I e II, respectivamente). Após obtenção as proteínas avaliadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15 % e utilizadas como antígeno de fase sólida para determinação do sorotipo.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Análise de Variância (ANOVA) e a comparação entre médias realizada por *Bonferroni post-test*, sendo a significância estatística considerada sempre que $p < 0,05$. Os cálculos de sensibilidade e especificidade foram realizados com o suporte do *software* MedCalc.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram organizados em três etapas, para melhor compreensão da proposta. Inicialmente, são descritos os resultados de obtenção e caracterização das proteínas recombinantes Δ NS1 dos DENVs. Na segunda etapa, relatamos a aplicabilidade dos antígenos obtidos no diagnóstico sorológico específico da dengue, utilizando a plataforma de ELISA. Por fim, descrevemos os resultados da utilização das proteínas recombinantes na identificação dos quatro sorotipos do DENV a partir da resposta de anticorpos IgG anti-NS1, utilizando também a plataforma de ELISA.

ETAPA 1 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Δ NS1 DOS DENVs 1-4

A primeira etapa deste trabalho teve como objetivo a obtenção das proteínas recombinantes Δ NS1 dos DENVs, que correspondem ao fragmento C-terminal das proteínas NS1 e serão utilizados nas estratégias de diagnóstico. Em uma primeira etapa realizamos caracterizações das sequências e estruturas dos antígenos estudados.

4.1 AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Δ NS1 DOS DENVs

A avaliação inicial das sequências das proteínas foi realizada *in silico* utilizando ferramentas *online* de bioinformática. As sequências de aminoácidos correspondentes às Δ NS1 dos DENVs 1-4 foram alinhadas e as identidades avaliadas com o algoritmo Clustal Omega, permitindo anotar valores de identidade que variaram entre 74 a 85 % entre os quatro tipos de DENV (Tabela 3). Realizamos também a análise do perfil hidrofóbico das sequências e os resultados da predição mostram que essas proteínas são constituídas, principalmente, por sítios de caráter hidrofílico (Figura 4 A-D). Avaliou-se ainda a presença de epítomos conformacionais por meio do algoritmo CBTOPE (*Conformational B-cell epitope prediction*) que demonstrou a presença de epítomos para células B nas quatro proteínas (figura 5 A-D). Esses dados sugerem que as quatro proteínas recombinantes preservam epítomos imunogênicos e, portanto, apresentariam características de antigenicidade e imunogenicidade em relação às proteínas nativas.

Tabela 3 – Percentual de identidade da sequência de aminoácidos das Δ NS1 dos DENVs

Identidade das proteínas Δ NS1				
SOROTIPO	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
DENV1	-	85,15	83,81	74,29
DENV2	85,15	-	85,15	78,22
DENV3	83,81	85,15	-	77,14
DENV4	74,29	78,22	77,14	-

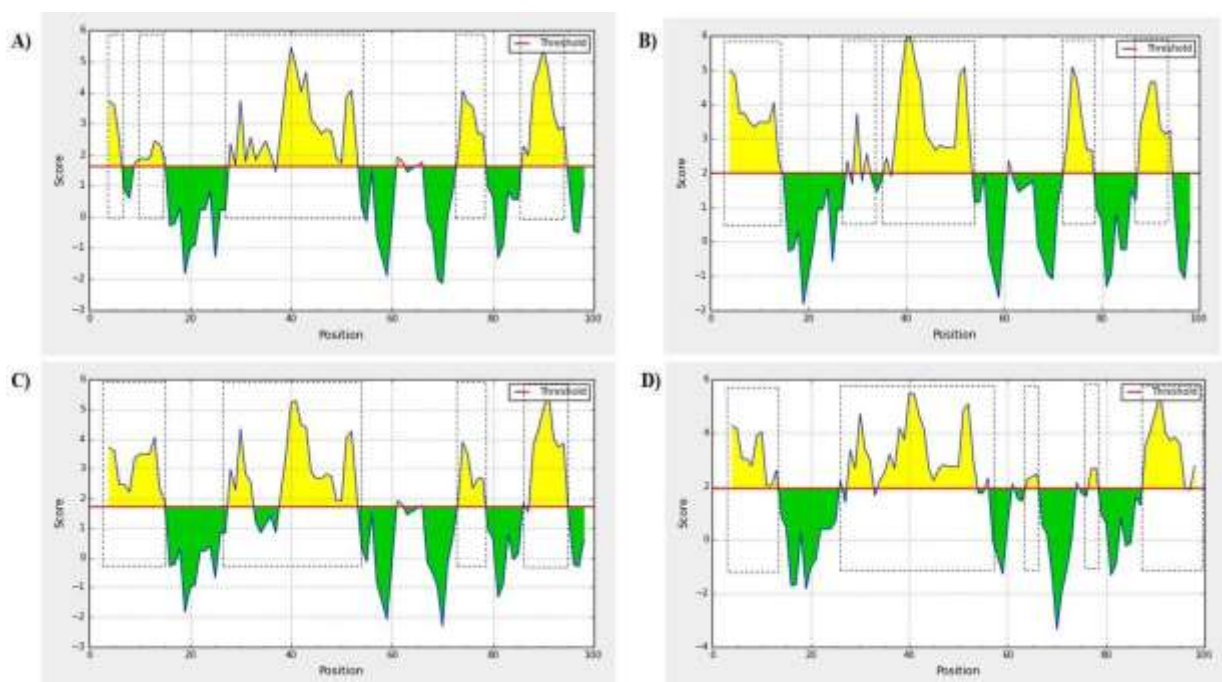


Figura 4 - Análise do perfil de hidrofobicidade das proteínas Δ NS1 dos DENVs. As sequências de aminoácidos das proteínas recombinantes foram utilizadas na predição do perfil de hidrofobicidade utilizando ferramenta *online* de bioinformática disponível no banco de dados do IEDB. Descrição: (A, B, C e D) correspondem, respectivamente, a predição para as proteínas Δ NS1 dos sorotipos 1, 2, 3 e 4, onde as regiões em amarelas e em destaque (acima do *threshold*) são sítios preditos como hidrofílicos e as verdes representam porções hidrofóbicas. Na figura o *Score* representa a pontuação para cada epítipo predito e a *Position* indica a posição do resíduo na sequência.

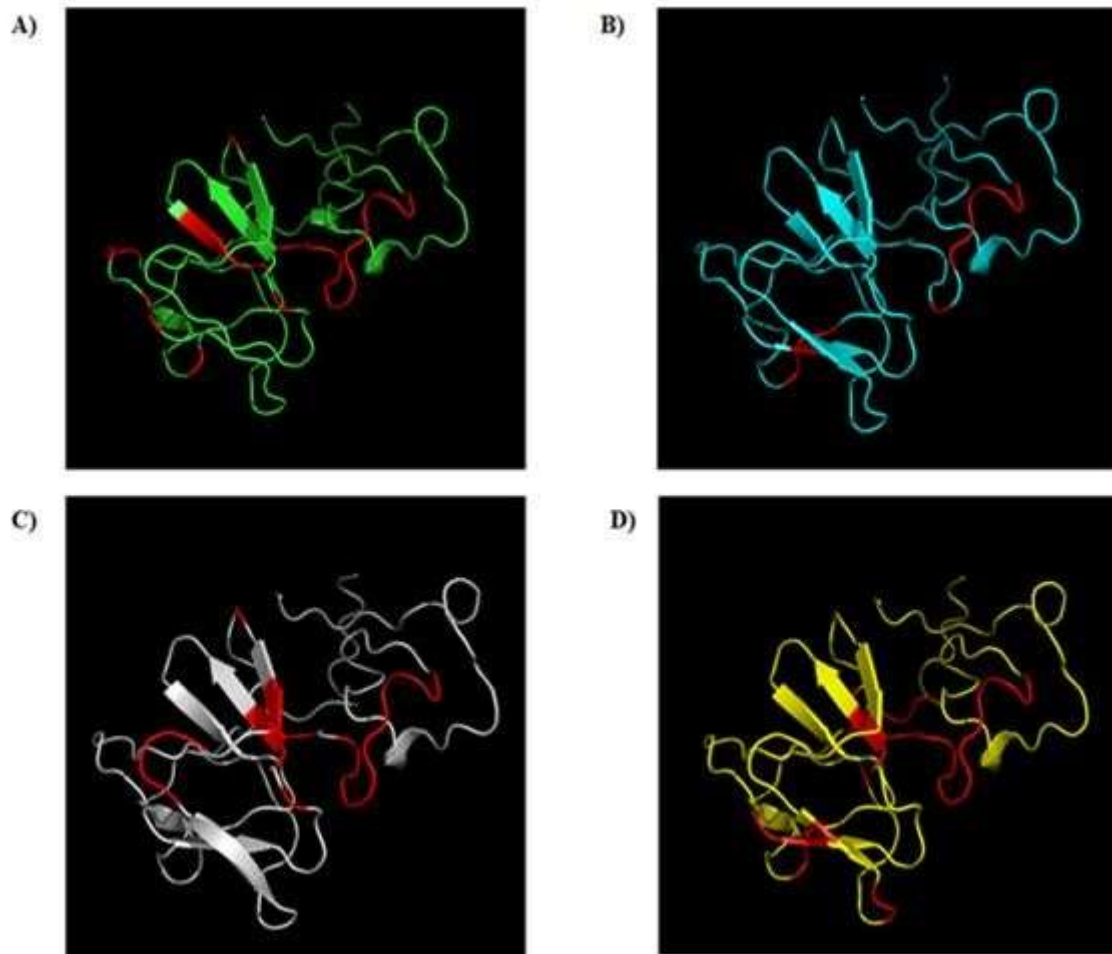


Figura 5 - Identificação de epítomos de células B para as proteínas recombinantes dos DENVs. As imagens representam a estrutura predita para as proteínas com destaque (em vermelho) para os epítomos conformacionais preditos para células B. Descrição: (A, B, C e D) correspondem, respectivamente, à estrutura predita para as proteínas Δ NS1 dos sorotipos 1, 2, 3 e 4.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVs (1, 2, 3 E 4)

A confirmação da obtenção dos genes de interesse foi feita por análise de restrição com as enzimas *XhoI* e *BamHI* e o produto de digestão avaliado em gel de agarose 0,8 %. A análise eletroforética permitiu identificar o vetor plasmidial linearizado com o tamanho esperado de ~5685 pb, assim como os genes de interesse com ~316 pb (Figura 6).

Os vetores de expressão pET28a- Δ NS1 dos DENVs foram utilizados na transformação das linhagens de *E. coli* BL21 (DE3), pLysS e ArticExpress. A expressão das proteínas recombinantes nos transformantes foi analisada por SDS-PAGE, o que permitiu a identificação dos antígenos após a indução da expressão por meio da adição de IPTG. A análise eletroforética demonstrou proteínas com peso molecular de ~16 kDa que corresponde

ao esperado para as proteínas Δ NS1 (Figura 7). A expressão foi confirmada por imunoensaio de *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal contra a cauda de histidina (anti-*HisTag*). Na condição avaliada, a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) apresentou os melhores níveis de expressão para todas as proteínas recombinantes, portanto, foi escolhida para expressão dos antígenos proteicos.

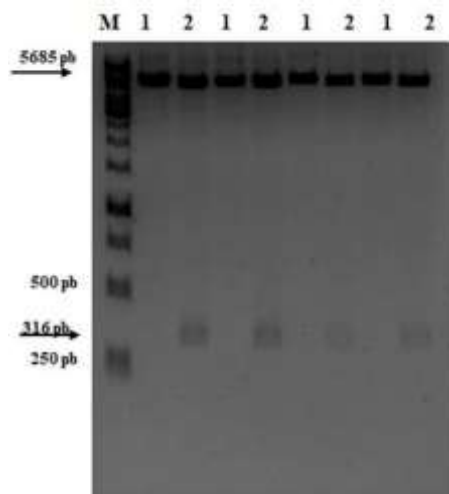


Figura 6 - Análise de restrição dos vetores de expressão das proteínas recombinantes Δ NS1 dos DENVs 1- 4. Análise de restrição com as enzimas *BamHI* e *XhoI*, possibilitando identificar os fragmentos dos genes de interesse com tamanho esperado (~316 pb). Descrição: Em (A) Gel de agarose 0,8 % da análise de restrição, onde (M) Marcador 1 kb (1) pET28a- Δ NS1 dos vírus Dengue 1-4 linearizado com a enzima *XhoI*; (2) pET28a- Δ NS1 dos vírus Dengue 1-4 digeridos com as enzimas *BamHI* e *XhoI*. Os vetores de expressão da proteína de cada um dos sorotipos estão organizados em ordem da esquerda para direita (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4).

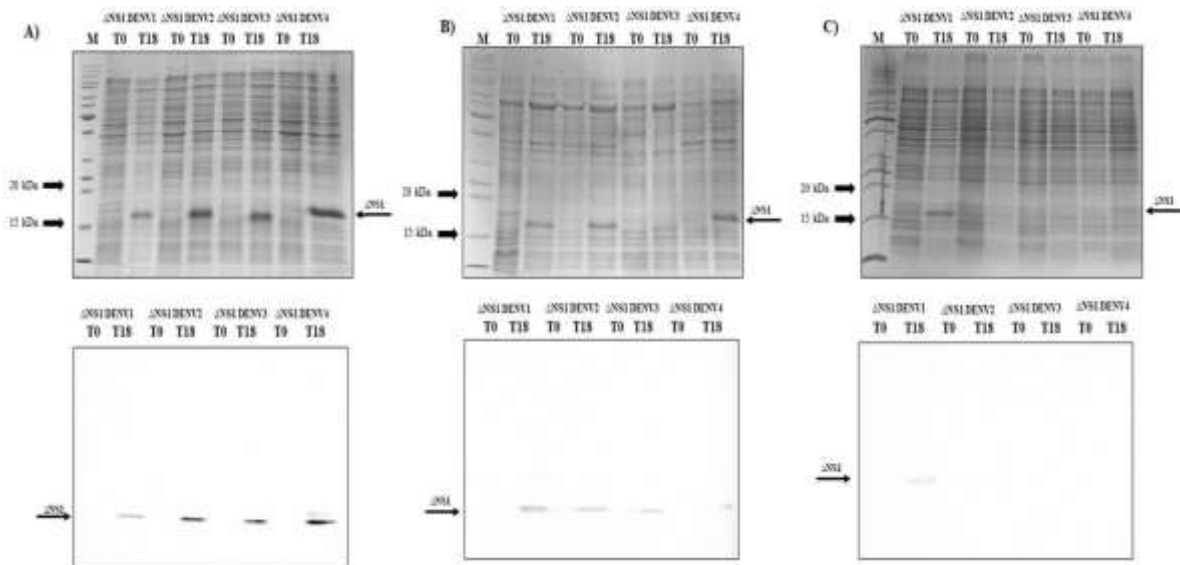


Figura 7 - Expressão das proteínas recombinantes Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4) em sistema procarioto. As linhagens de *E. coli* foram transformadas com os vetores de expressão pET28a- Δ NS1 dos vírus Dengue 1, 2, 3 e 4 e cultivadas para avaliar a expressão dos antígenos. A expressão foi avaliada em gel de SDS-PAGE 15 % e imunodeteccção por *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal *anti-HisTag*. Descrição: (A) expressão na linhagem BL21 (DE3), (B) expressão na linhagem *ArticExpress* (DE3) e em (C) expressão na linhagem pLys (DE3), (M) marcador de massa molecular, (T0) alíquota pré indução, (T18) alíquota após indução.

Em seguida, a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi cultivada em diferentes condições, com a finalidade de identificar os melhores parâmetros para a expressão dos antígenos, variando o tempo e a temperatura de indução, bem como a concentração do indutor (IPTG). Das condições avaliadas, as variações no período de indução, por 2h, 3h e 18h representaram a principal variável em relação ao estado de solubilização das proteínas. Entretanto, para todas as condições avaliadas, a proteína foi expressa, predominantemente, em corpúsculos de inclusão na fração insolúvel, como identificado em gel de policrilamida a 15 % (figura 8 A-D). A partir destes resultados, para ensaios posteriores adotou-se a condição de 18 horas de indução na presença de 0,5 mM de IPTG e a 18 °C.

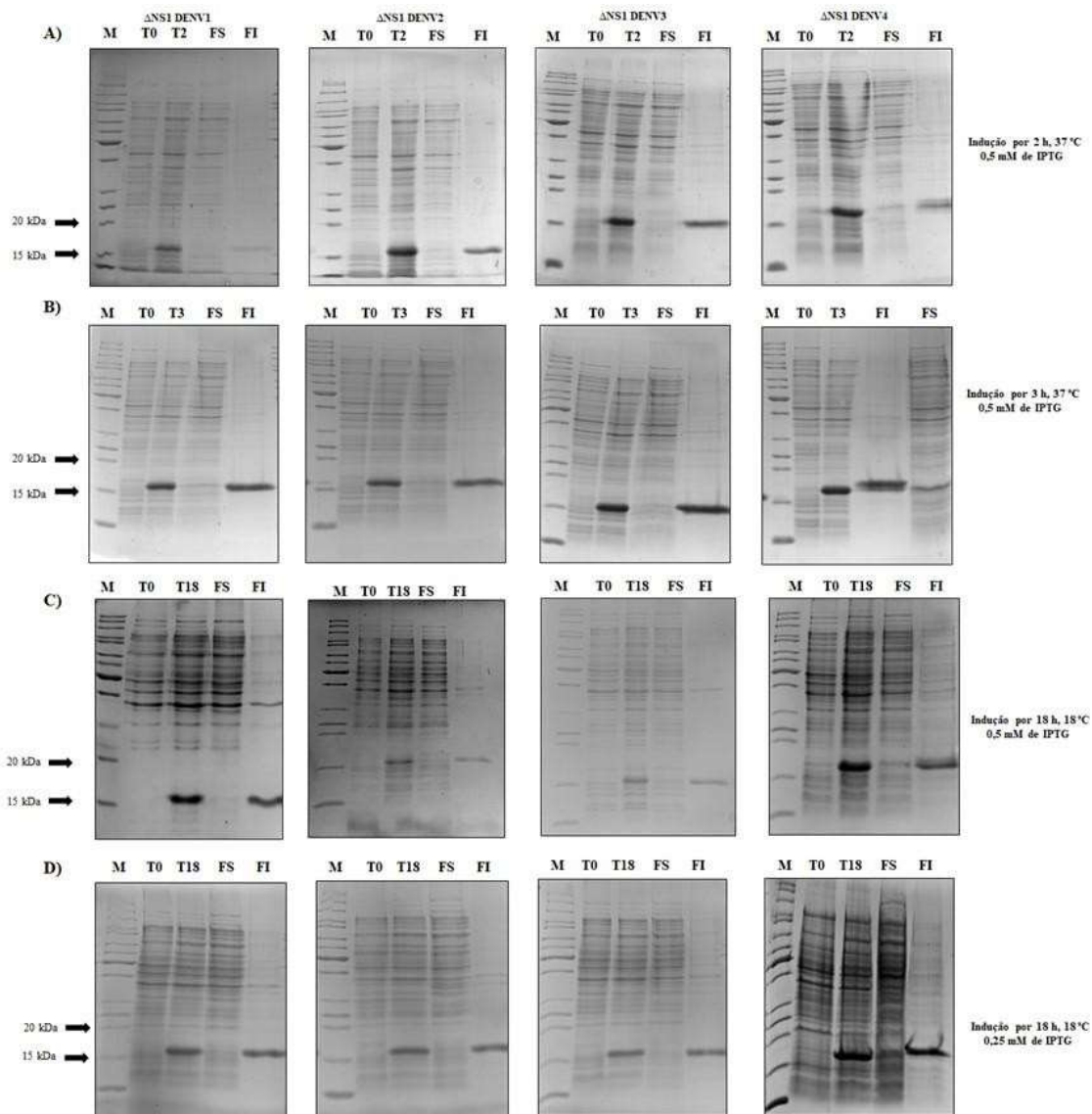


Figura 8 - Teste de expressão das proteínas recombinantes Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4) em *Escherichia coli* BL21 (DE3). A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi cultivada em diferentes condições de temperatura, período de indução e concentração de IPTG para avaliar a melhor condição de expressão. A expressão das proteínas nas frações solúvel e insolúvel foi avaliada em SDS-PAGE com gel de poliacrilamida a 15 %. Descrição: (A e B) testes de expressão com cultura induzida ao atingir DO_{600} de 0,6 a 0,8, com 0,5 mM de IPTG, a 37 °C, por 2 e 3 horas, respectivamente, (C e D) testes de expressão com cultura induzida ao atingir DO_{600} de 2, com 0,5 e 0,25 mM de IPTG, respectivamente, e por 18 horas a 18 °C, (M) marcador de massa molecular, (T0) alíquota pré indução, (T18) alíquota pós indução, (FS) fração solúvel e (FI) fração insolúvel, cada uma das colunas representa as proteínas Δ NS1 dos DENVs 1-4.

4.3 PURIFICAÇÃO, ANTIGENICIDADE E IMUNOGENICIDADE DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVs (1, 2, 3 E 4)

A técnica de *refolding* por diluição pulsátil permitiu obter as proteínas a partir da fração insolúvel do extrato proteico. O extrato proteico insolúvel foi solubilizado em solução contendo 8 M de ureia, para obtenção da proteína solúvel e íntegra. A remoção da ureia foi

feita pela diluição do extrato em tampão A, sob agitação suave. Visando otimizar as condições de *refolding*, foi realizada uma curva salina em que as purificações das proteínas foram feitas em tampões contendo as seguintes concentrações de NaCl: 150 mM (CI), 300 mM (CII) e 500 mM (CIII). Os resultados da quantificação e intensidade das bandas das proteínas purificadas em gel de eletroforese permitiram inferir que com CIII foi obtido o melhor rendimento em massa (figura 9). Contudo, nessa condição os antígenos de interesse apresentavam-se altamente instáveis, sendo observados sinais de precipitação, por isso para as proteínas Δ NS1 dos DENVs 1, 2 e 4 adotou-se a condição CII (NaCl 300 mM) e para a Δ NS1 do DENV 3 a condição CI (NaCl 150 mM) durante a realização do *refolding* e purificação.

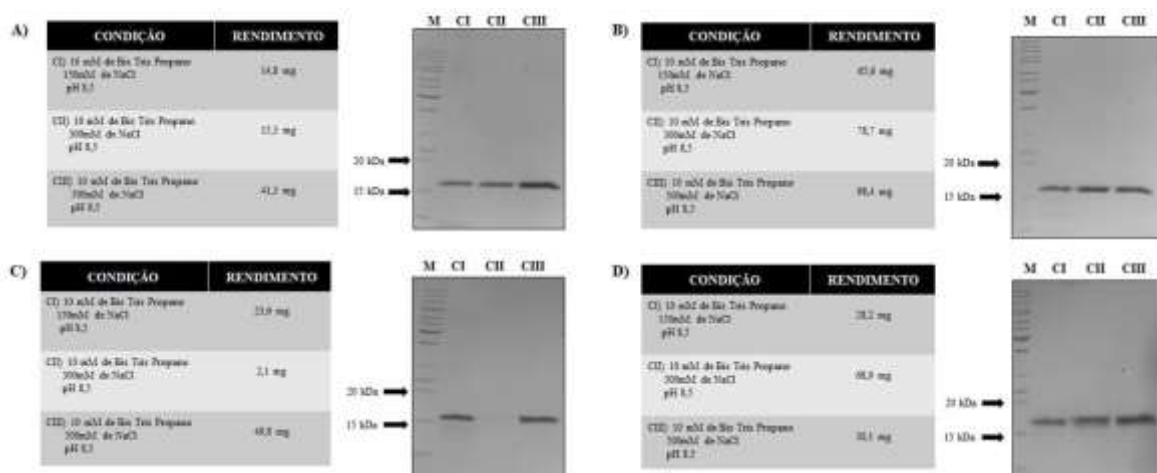


Figura 9 - Otimização das condições de purificação das proteínas recombinantes Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4). As proteínas foram purificadas com tampões contendo NaCl nas concentrações de 150 mM, 300 mM e 500 mM. O rendimento em massa/litro (mg/L) de cultura foi calculado para identificar a melhor condição de purificação. Descrição: (A, B, C e D) representam, respectivamente, a tabela com rendimento em massa/L de cultura e gel de SDS-PAGE 15 % das proteínas Δ NS1 DENVs 1, 2, 3 e 4.

Após a renaturação, a purificação das proteínas foi realizada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) em sistema AKTA. A eluição das proteínas, em gradiente crescente de imidazol, resultou em um pico único nos cromatogramas (figura 10 A, D, G e J). Alíquotas correspondentes ao pico da eluição, assim como dos *steps* de 20 mM e 1000 mM de imidazol e do extrato proteico, foram submetidas à eletroforese, sendo as proteínas purificadas visualizadas com elevado grau de pureza e massa molecular correspondente ao estimado de ~16 kDa (figura 10 B, E, H e K). A identidade das proteínas foi confirmada por imunoensaio de *Western blotting* com soro policlonal específico para cada um dos sorotipos do vírus Dengue (figura 10 C, F, I e L). O rendimento esperado

em massa por litro de cultura induzido (mg/L) foram de: 15,3 mg, 78,75 mg, 23,6 mg e 68,9 mg para as proteínas Δ NS1 dos DENVS 1, 2, 3 e 4, nessa ordem.

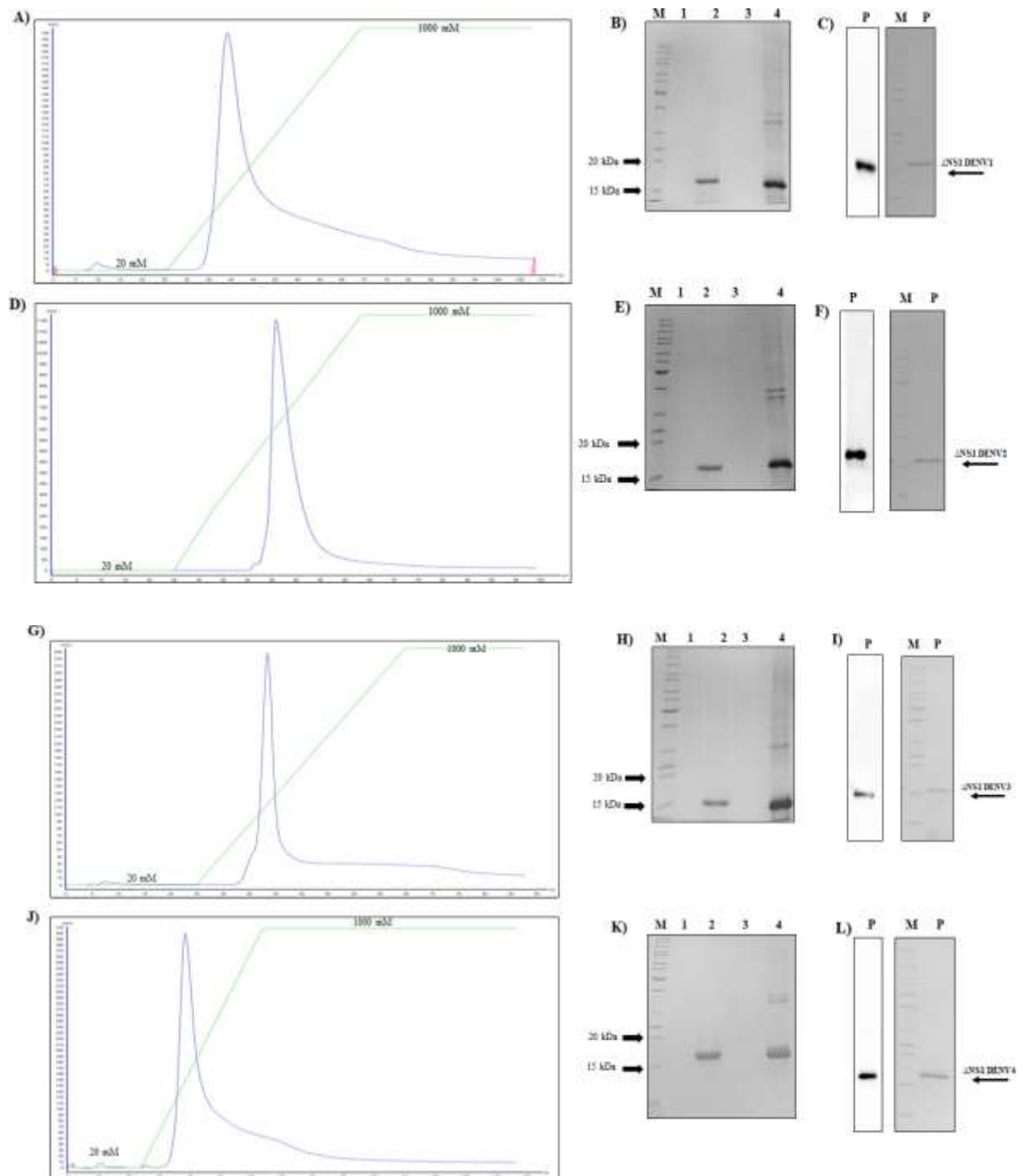


Figura 10 - Purificação das proteínas Δ NS1 dos DENVs. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel. Alíquotas das proteínas purificadas foram submetidas à SDS-PAGE 15 % para avaliação da pureza e imunodeteccção com anticorpos mono-específicos para cada um dos sorotipos dos vírus Dengue. Descrição: (A, D, G, J) cromatogramas da eluição em gradiente de imidazol das proteínas Δ NS1 dos vírus Dengue 1, 2, 3 e 4, respectivamente, (B, E, H e K) avaliação das etapas de purificação das proteínas recombinantes dos DENVs 1, 2, 3 e 4, respectivamente, por SDS-PAGE 15 %, (C, F, I e L) imunoenensaio por *Western blotting* para deteccção das proteínas purificadas dos DENVs 1, 2, 3 e 4, nesta ordem. Amostras analisadas nos géis: (M) marcador de massa molecular, (1) Alíquota correspondente ao *step* de 20 mM do

cromatograma, (2) alíquota correspondente ao pico da proteína purificada, (3) *flow through*, (4) extrato proteico solúvel diluído em tampão C, (P) proteína purificada.

As proteínas foram caracterizadas quanto ao volume hidrodinâmico por meio do ensaio de *Dynamic Light Scattering* (DLS). As medições do diâmetro de cada uma das proteínas de interesse associadas ao erro padrão não permitiram estabelecer diferenças significativas no volume hidrodinâmico das proteínas Δ NS1 dos DENVs 1, 2 e 4, apenas com a Δ NS1 do DENV 3 (figura 11 A-D). Além disso, os resultados obtidos no DLS permitem identificar elevada homogeneidade das amostras de proteínas purificadas, com índice de polidispersão entre 0,23 e 0,51, valores característicos de amostras monodispersas. Não foram observados agregados, indicando que as condições de produção previamente otimizadas são adequadas para a manutenção da estabilidade das amostras. Esses resultados, em associação com a análise eletroforética, confirmam a elevada pureza dos antígenos obtidos.

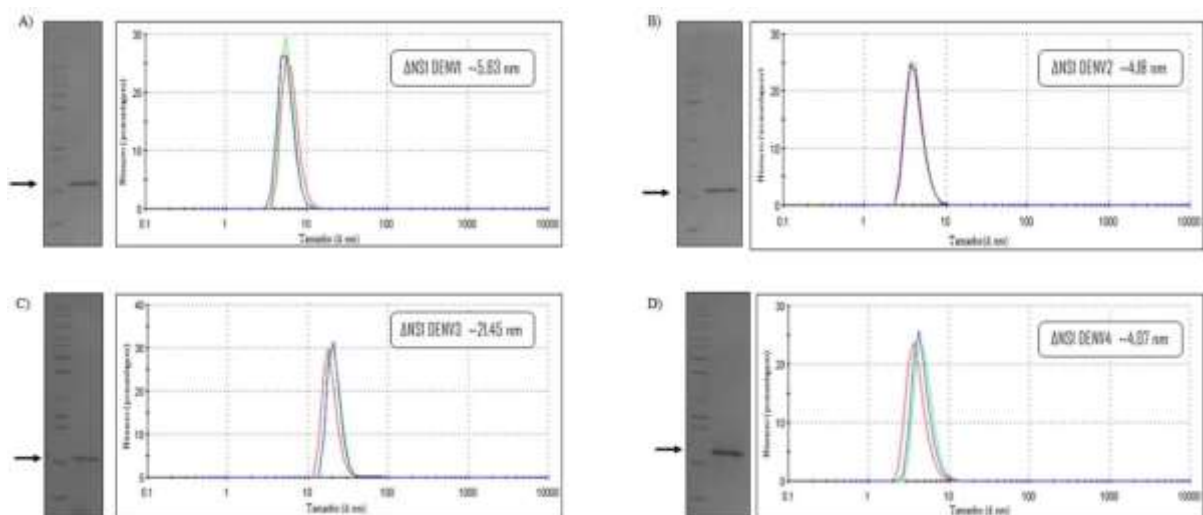


Figura 11 - Distribuição da medida de tamanho das proteínas Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4). Os antígenos purificados foram caracterizados quanto ao volume hidrodinâmico utilizando ensaio de DLS. As curvas ($n=3$) representam as medições realizadas em triplicata que permitiram identificar o diâmetro médio \pm o erro padrão (em nanômetros) das partículas presente no meio. Descrição: (A) distribuição de tamanho da proteína Δ NS1 DENV 1 é equivalente a $5,63\text{nm} \pm 1,266$, (B) distribuição de tamanho da proteína Δ NS1 DENV 2 é equivalente a $4,18\text{nm} \pm 1,07$, (C) distribuição de tamanho da proteína Δ NS1 DENV 3 é equivalente a $21,45 \pm 4,18$, (D) distribuição de tamanho da proteína Δ NS1 DENV 4 é equivalente a $4,07 \pm 1,15$.

As proteínas recombinantes foram avaliadas, quanto à estrutura antigênica após as etapas de expressão e purificação. Por isso utilizamos as Δ NS1 DENVs com a sua conformação íntegra ou desnaturadas termicamente, em ensaios de ELISA. Nas condições avaliadas, o reconhecimento da proteína íntegra, por soros murinos α -DENV, foi superior ao reconhecimento da proteína desnaturada, sendo sugestivo de que as proteínas preservam epítomos conformacionais (figura 12). Os resultados demonstram também que epítomos

lineares também mantiveram a antigenicidade. O resultado foi confirmado por ensaio de *Dot blot*, no qual as proteínas foram adsorvidas nas mesmas condições descritas previamente em membranas de nitrocelulose. As quais foram reveladas e visualizadas em aparelho transluminador, sendo observado maior sinal de detecção para as proteínas com a conformação íntegra, quando comparado com as proteínas desnaturadas termicamente (figura 12 A-D). Como controle negativo do ensaio utilizou-se a toxina de Shiga (Stx) (disponível no laboratório), que não foi reconhecida pelos soros.

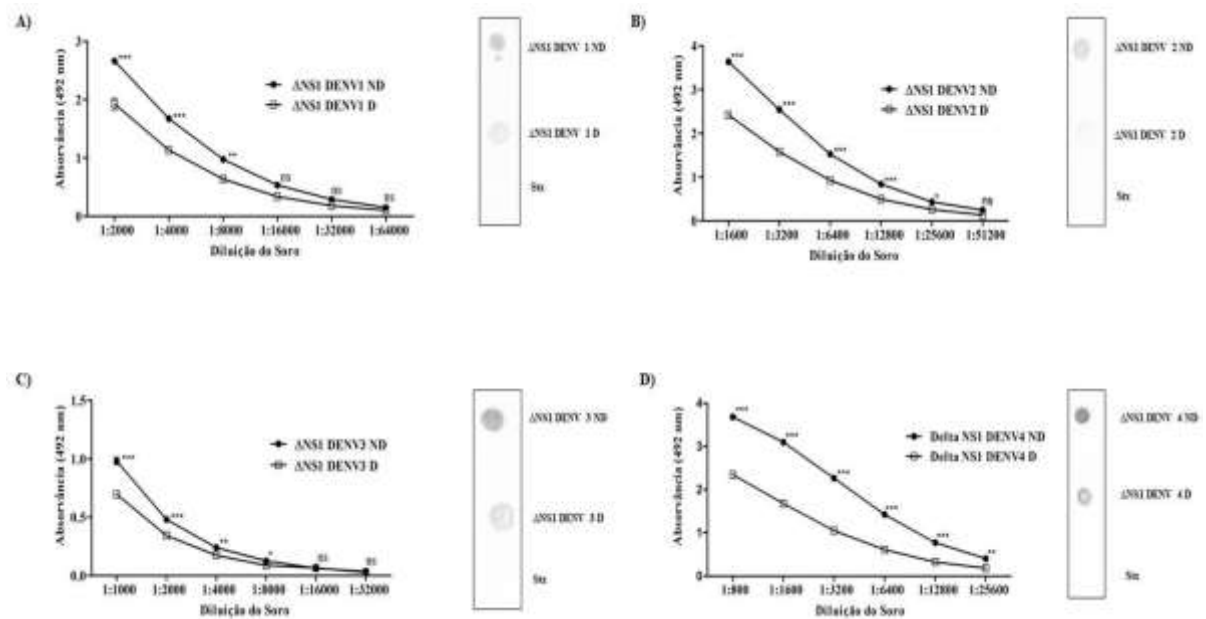


Figura 12 - Avaliação antigênica das proteínas recombinantes Δ NS1 dos vírus Dengue 1, 2, 3 e 4. As antigenicidades das proteínas recombinantes foram avaliadas por meio de ensaios de ELISA e *Dot Blot*, utilizando soro α -DENV. As placas de ELISA e as membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com cada um dos antígenos na conformação íntegra (ND) e após desnaturação térmica (D). No ensaio de *Dot blot* utilizou-se como controle negativo a proteína recombinante Stx. Os resultados do ELISA representam a média \pm erro padrão de um experimento realizado em duplicata, em que *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,1$ e ns $p > 0,05$. Descrição: (A, B, C e D) correspondem ao ELISA de antigenicidade e *Dot Blot* com a proteína Δ NS1 DENV 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

As proteínas recombinantes purificadas foram administradas em camundongos em associação com o adjuvante LT1 (toxina termolábil 1 de *E. coli*) e os níveis de anticorpos avaliados após cada uma das doses. O protocolo utilizado permitiu confirmar que as proteínas preservam propriedades imunogênicas, sendo observado títulos de anticorpos IgG α - Δ NS1 específicos após a segunda dose (figura 13 A e B). Além disso, os anticorpos α - Δ NS1 DENV4 foram utilizados em ensaio de citometria com células Vero infectadas com o DENV4, com a finalidade de identificar se os anticorpos produzidos contra a Δ NS1 recombinante reconheciam a proteína NS1 nativa nas células infectadas. Como controle positivo do ensaio

foi realizado a marcação com anticorpo monoclonal 4G2 que é capaz de reconhecer a partícula viral, indicando que há infecção das células. Além disso, para confirmar a especificidade dos anticorpos policlonal e monoclonal realizamos a marcação de células não infectadas. Como esperado, não houve reatividade com as células não infectadas, comprovando a especificidade dos anticorpos. Os resultados obtidos demonstram que os anticorpos foram capazes de reconhecer a NS1 das células infectadas (figura 13 C-E).

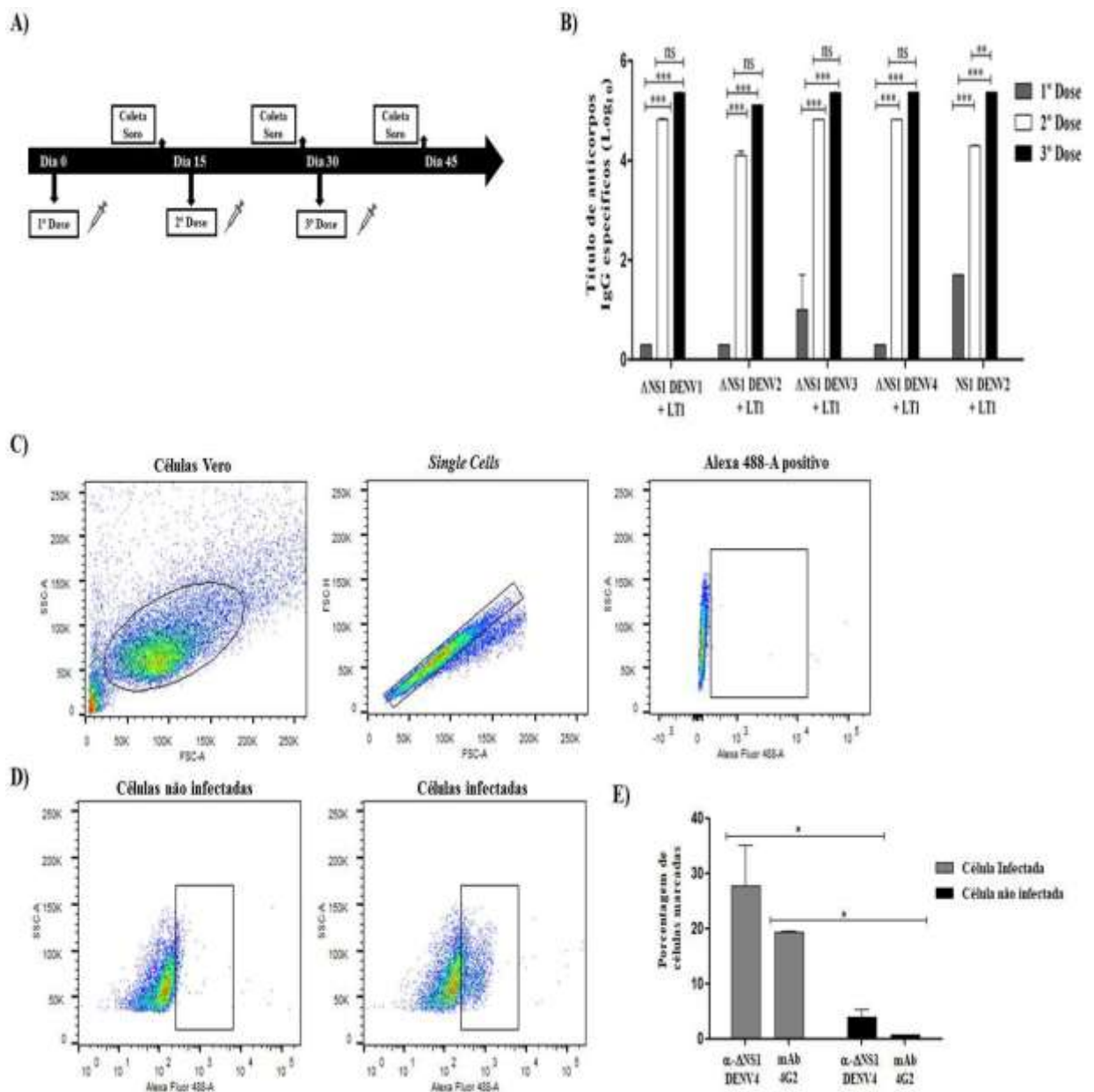


Figura 13 - Imunogenicidade das proteínas recombinantes Δ NS1 dos vírus Dengue 1, 2, 3 e 4. As proteínas foram administradas em camundongos e o título de anticorpos foi avaliado após cada uma das doses. Avaliou-se também a capacidade dos anticorpos (anti- Δ NS1 DENV4) reconhecerem a proteína NS1 nativa produzida em células Vero infectadas com o DENV4. Descrição: (A) protocolo de imunização, (B) ELISA para determinação do título de anticorpos anti- Δ NS1 dos DENVs e NS1 DENV2 (C) estratégia de análise utilizada no ensaio de citometria, (D) população de células Vero infectadas e não infectadas com DENV 4 e marcadas com o anticorpos anti- Δ NS1 DENV4, (E) percentual de células Vero infectadas e não infectadas com DENV 4 e marcadas com anti- Δ NS1 DENV4, e como controle positivo do ensaio o monoclonal 4G2. Os resultados do ELISA e citometria representam a média \pm erro padrão de um experimento realizado em duplicata, onde *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,1$ e ns $p > 0,05$.

ETAPA 2 - AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVS 1-4 NO DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DA DENGUE

A segunda etapa teve como objetivo avaliar o potencial dos antígenos recombinantes para o diagnóstico sorológico específico de infecções prévias pelo vírus Dengue. Desse modo, estão relatados os resultados de obtenção de soros hiperimunes, caracterização das respostas α - Δ NS1 e validação da especificidade sorológica dos antígenos.

4.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO MONOESPECÍFICO AOS DENVS

A validação das proteínas no diagnóstico sorológico específico da dengue foi realizada com soros de animais infectados com os vírus Dengue. Inicialmente foi feita a confirmação dos vírus disponíveis no laboratório por biologia molecular, utilizando os ensaios de RT-PCR e PCR com *primers* específicos descritos na literatura. Os resultados obtidos permitiram a identificação dos fragmentos de cDNA com 482 pb, 119 pb, 290 pb e 392 pb, que correspondem ao esperado para os DENVs 1, 2, 3 e 4, respectivamente (figura 14 A). Uma vez que a identidade dos lotes virais foi confirmada, foram feitas as infecções com doses não letais de cada vírus, sendo coletadas amostras de sangue para as análises subsequentes (figura 14B).

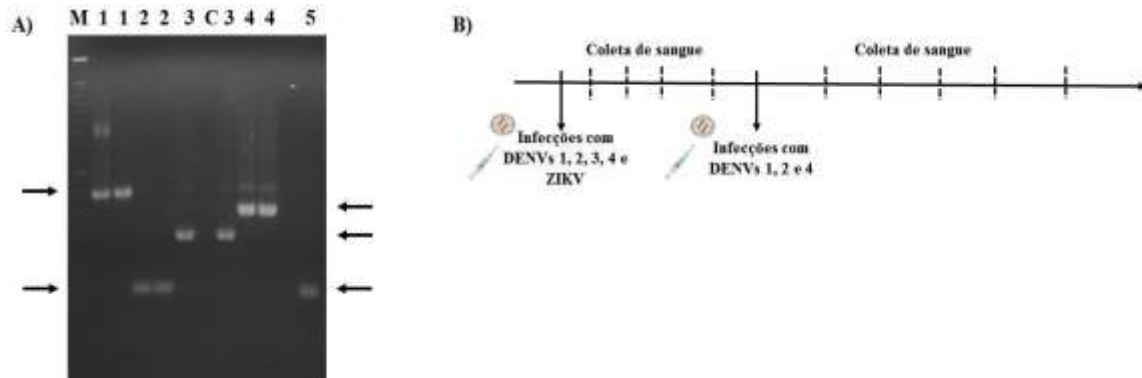


Figura 14 - Produção de soro monoespecífico contra os vírus Dengue e ZIKV. Amostras de soros monoespecíficos a cada um dos sorotipos do vírus Dengue e Zika foram obtidas por meio de infecção não letal em camundongos. Descrição: (A) análise dos produtos da PCR para tipagem molecular dos DENVs, em gel de agarose 1,5 %, (M) marcador de massa molecular, (1, 2, 3, 4, 5) correspondem, respectivamente, aos fragmentos de cDNA dos sorotipos 1, 2, 3, 4 e ZIKV (setas em destaque), (C) amostra controle, (B) protocolo do regime de infecção dos animais.

As amostras de soros coletadas nos dias 1, 7, 21, 30 e 50 após a infecção foram avaliadas para estabelecer a cinética de produção de anticorpos α - Δ NS1. Os resultados demonstram que há uma forte resposta de anticorpos direcionada contra a NS1, principalmente, com os DENVs 2, 3 e 4, como observado pelos títulos de IgG. Além disso, os títulos de anticorpos direcionados ao antígeno se mantiveram até o dia 50 DPI, sendo sugestivo de respostas robustas e de longa duração (figura 15 A). Soros obtidos dos animais inoculados apenas com o veículo (meio de cultura) não apresentaram reatividade com as proteínas. Avaliou-se também o reconhecimento diferencial entre a proteína NS1 do DENV2 e o fragmento Δ NS1 do DENV2, e observou-se que, mesmo utilizando um fragmento da NS1, há reatividade semelhante entre os antígenos, como confirmado pelo título de anticorpos semelhante dos dois antígenos em ensaio de ELISA (figura 15 B).

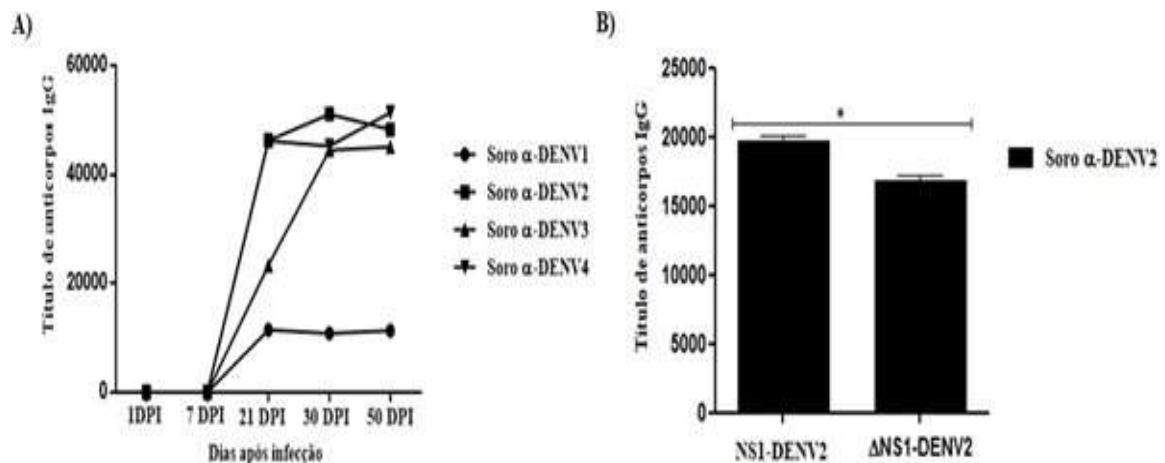


Figura 15 - Caracterização dos soros mono-específicos contra os vírus Dengue 1-4. As cinéticas das respostas de anticorpos contra as proteínas Δ NS1 foram avaliadas nos dias 1, 7, 21, 30, 50 após a infecção. Avaliou-se também o reconhecimento diferencial entre as proteínas NS1 e Δ NS1 do vírus Dengue 2. Descrição: (A) cinética de detecção das proteínas Δ NS1 DENVs 1-4 após regime de infecção, (B) reconhecimento diferencial entre as proteínas NS1 DENV2 e Δ NS1-DENV2. Os resultados representam a média de um experimento realizado em duplicata, em que * $p < 0,1$, ns $p > 0,05$ (One-way ANOVA, com t Test).

4.5 ESPECIFICIDADE DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVS

Na sequência, analisou-se a especificidade das proteínas Δ NS1 dos quatro DENVs frente a uma amostra de soro ZIKV positivo. Investigar o reconhecimento específico desses antígenos frente ao soro zikv é relevante, visto que essa representa uma das mais importantes arboviroses em países tropicais. Os resultados mostram que os antígenos apresentam especificidade sorológica. Apenas a proteína Δ NS1 do DENV3 apresentou reatividade cruzada, ainda assim, observa-se diferença estatística quando se compara com o título obtido com o antígeno específico (Δ NS1 ZIKV) (figura 16 A). No entanto, quando os antígenos são submetidos à desnaturação térmica observa-se redução na especificidade, devido ausência de diferença estatística significativa entre os títulos medidos com as proteínas Δ NS1 de ZIKV e DENV3 (figura 16 B). Além disso, a especificidade das proteínas foi validada utilizando a amostra de soro ZIKV normalizada para DO_{492} de 1, baseado na interação do soro com seu antígeno específico (Δ NS1 ZIKV), sendo possível confirmar a especificidade sorológica dos antígenos (figura 16 C). Avaliamos tratamentos com a finalidade de reduzir a reatividade com a proteína do DENV3. Para isso utilizamos a solução de ureia 6 M, capaz de eliminar anticorpos de baixa afinidade pelo antígeno, assim como a adsorção do soro com a Δ NS1 ZIKV que permite a captação dos anticorpos IgG anti-NS1 ZIKV. A utilização de etapa

prévia de adsorção do soro com a Δ NS1 ZIKV mostrou-se como o tratamento mais promissor, eliminando a reatividade cruzada (figura 16 D).

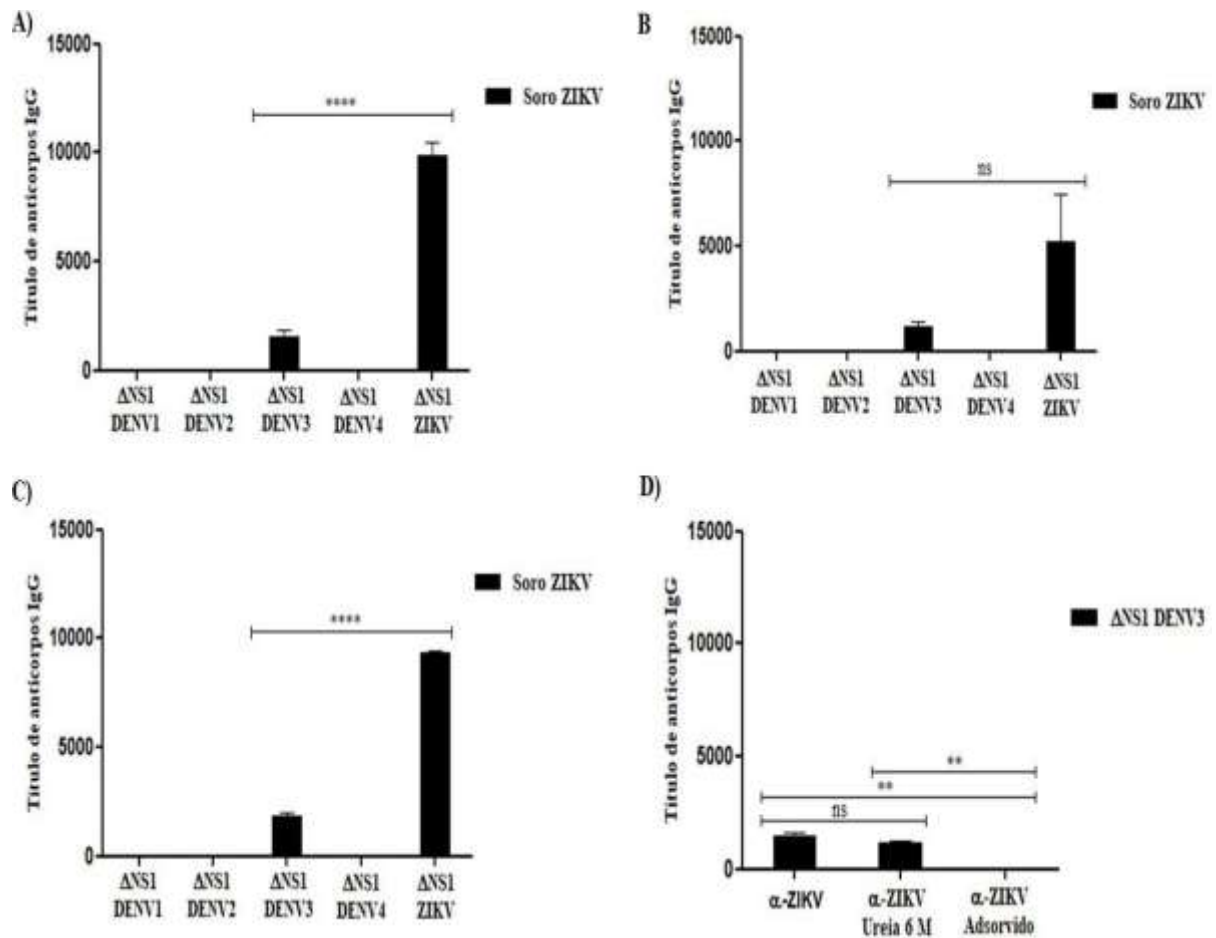


Figura 16 – Avaliação da especificidade das proteínas Δ NS1 frente à amostra de soro de animal infectado com ZIKV. A especificidade sorológica dos antígenos recombinantes foi avaliada frente a uma amostra de soro ZIKV positivo. Descrição: (A e B) representam a reatividade das proteínas íntegras e fervidas, respectivamente, frente à amostra de soro ZIKV positivo, (C) reatividade das proteínas íntegras frente à amostra de soro ZIKV normalizado, (D) reatividade da proteína Δ NS1 DENV3 após tratamentos com ureia 6 M e adsorção com a Δ NS1-ZIKV. Os resultados correspondem à média do título de anticorpos após realização de dois ensaios (A e B), ou à média de um ensaio realizado em duplicata (C e D), em que **** p <0,0001, ** p <0,01 e ns p >0,05 (One-way ANOVA, com post-test Bonferroni's).

Com a finalidade de determinar o potencial das Δ NS1 no diagnóstico sorológico específico da dengue utilizamos a mistura das proteínas em ensaio de ELISA com amostras de soros colhidos de camundongos infectados com cada um dos tipos de vírus Dengue e vírus Zika. Primeiramente, estabelecemos a quantidade em massa de cada um dos antígenos que permitisse a detecção de anticorpos IgG α - Δ NS1. Após a titulação dos antígenos foi padronizado a quantidade de 150 ng/poço para a Δ NS1 do DENV1 e 100 ng/poço para as Δ NS1 dos DENVs 2, 3 e 4 (figura 17 A). Em seguida, investigamos se a mistura das proteínas

seria detectada por soros específicos a cada um dos sorotipos do DENV. Os resultados mostrados na figura 17 indicam que as quatro proteínas foram reconhecidas de forma semelhante. Constatamos reatividade da amostra positiva para o ZIKV, no entanto, com diferença significativa quando comparado com as amostras DENV positivas (figura 17 B e C). Ao avaliarmos a estratégia frente a painel de soros murinos positivos e negativos para infecção primária por ZIKV e DENV, identificamos o reconhecimento específico de todas as amostras DENV positivas (figura 18 A). Esses resultados foram obtidos após determinação de *cut-off*, por meio do estabelecimento da curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*), na qual a combinação dos valores de sensibilidade e especificidade foram 100 %, com $P < 0,001$ (ilustrado na figura 18 B). Portanto, tal estratégia apresentou-se eficaz na identificação específica dos soros positivos para dengue, diferenciando de amostras positivas para ZIKV em ambiente laboratorial, sendo a próxima etapa a validação dos ensaios frente a painel de soros humanos.

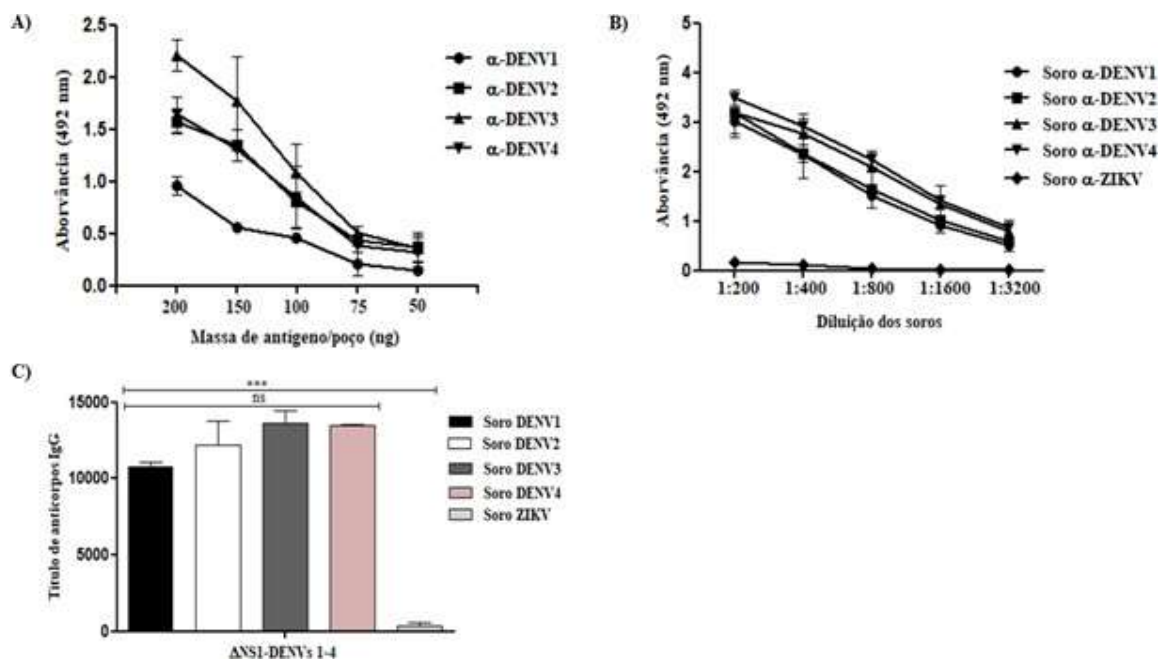


Figura 17 – Avaliação das proteínas Δ NS1 DENVs 1-4 no diagnóstico específico da dengue. A combinação das proteínas Δ NS1 dos quatro sorotipos do DENV foi utilizada em ensaio de ELISA para avaliar a aplicabilidade desses antígenos no diagnóstico específico de infecções prévias pelo vírus Dengue. Descrição: (A) titulação dos antígenos Δ NS1 utilizando soros específicos para os DENVs 1-4, (B) Detecção da mistura das proteínas, utilizando painel de soro murino monoespecífico para os DENVs e para o ZIKV, (C) Resultado da detecção da mistura de proteínas utilizando painel de soro monoespecífico para os DENVs e para o ZIKV, expresso em título de anticorpos IgG. Os resultados correspondem à média de dois ensaios realizados em duplicata, em que *** p<0,001 e ns p>0,05 (One-way ANOVA, com post-test Bonferroni's).

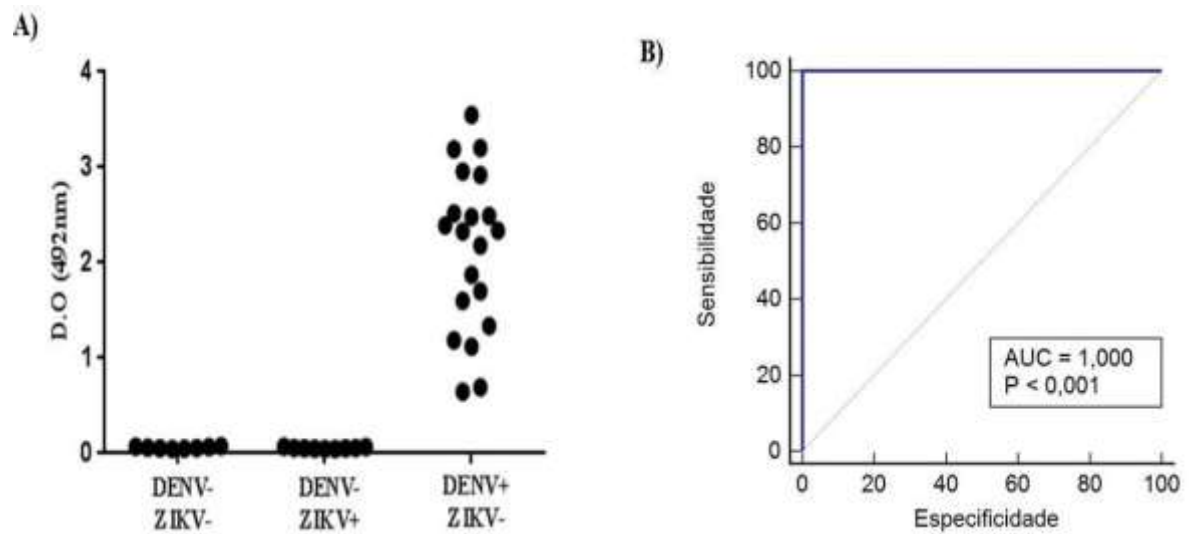


Figura 18 – Validação das proteínas Δ NS1 para o diagnóstico da dengue com painel de soro murino. A combinação das proteínas em ensaio de ELISA foi validada com painel de soro (37 amostras): DENV-/ZIKV-, DENV-/ZIKV+ e DENV+/ZIKV-. Os resultados da sensibilidade e especificidade do ELISA foram combinados para determinação da Curva ROC. Descrição: (A) reatividade das proteínas com painel de soro murino em ensaio de ELISA, (B) curva operacional padrão, os dados foram obtidos com intervalo de confiança de 95%. Os resultados representam à média de um experimento realizado em triplicata.

Visando avançar na validação da estratégia diagnóstica proposta, também foi determinado o potencial das Δ NS1 no diagnóstico sorológico específico da dengue utilizando amostras de soro humano previamente infectado pelo vírus Dengue 2, ou pelo vírus Zika e amostra controle de indivíduo não infectado por arbovírus. Os resultados obtidos foram semelhantes ao descrito anteriormente com amostras de soros de camundongos, sendo observado diferença significativa no título de anticorpos IgG do paciente infectado pelo DENV2, quando comparado com o paciente infectado pelo ZIKV (figura 19). Estes resultados, em associação, confirmam o potencial dos antígenos obtidos no diagnóstico sorológico específico de infecções prévias pelo vírus Dengue.

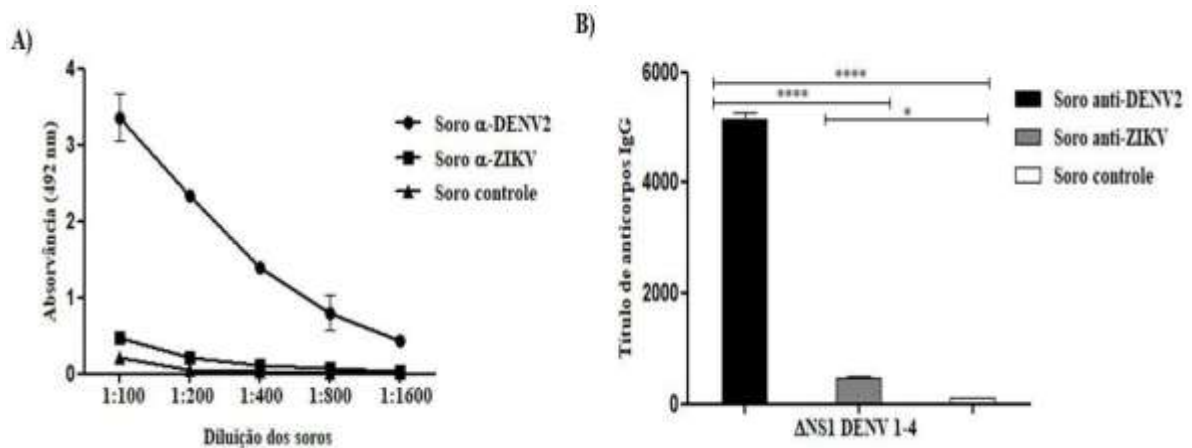


Figura 19 – Validação das proteínas Δ NS1 para o diagnóstico da dengue com amostras de soros humanos. O ELISA com a mistura das proteínas Δ NS1 também foi avaliado frente às amostras de soros humanos positivos para o DENV, ZIKV e soro controle negativo para infecções prévias por arbovírus. Descrição: (A) resultado da detecção das proteínas, expresso em valores de absorvância utilizando painel de soros específicos para o DENVs, ZIKV e soro controle negativo, (B) resultado da detecção das proteínas, expresso em título de anticorpos IgG específicos, utilizando painel de soro monoespecífico para o DENVs, ZIKV e soro controle negativo. Os resultados correspondem à média de dois experimentos realizados em duplicata, em que **** $p < 0,0001$, * $p < 0,1$ e ns $p > 0,05$ (One-way ANOVA, com post-test Bonferroni's).

ETAPA 3 - AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVs 1-4 NO DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DA DENGUE

O objetivo desta última etapa foi investigar o uso das proteínas Δ NS1 na detecção específica de cada um dos sorotipos do DENV. Por essa razão, são descritos os ensaios para avaliar especificidade dos antígenos e estratégias para identificação dos sorotipos.

4.6 ENSAIOS DE SOROTIPAGEM COM A PROTEÍNAS Δ NS1 DOS DENVs

Nessa etapa foi examinado o potencial das proteínas Δ NS1 dos DENVs 1-4 no diagnóstico de infecções prévias por cada um dos sorotipos do vírus com a plataforma de ELISA. Primeiramente avaliou-se a especificidade de cada um dos antígenos frente às amostras de soro contendo quantidade de anticorpos IgG equivalente aos anticorpos IgG antígeno-específicos (soros normalizados para DO_{492} de 1). Na condição avaliada, constatou-se que os antígenos possuem especificidade sorotipo específico, como observado pelos títulos de anticorpos IgG antígeno específico significativamente maior quando comparado aos títulos de anticorpos contra os antígenos heterólogos (figura 20 A-D). No entanto, foi verificado que, de forma inesperada, a proteína Δ NS1 do DENV3 apresentou reatividade cruzada frente ao

soro α -DENV1, ainda que exista diferença significativa entre o título de anticorpos IgG dos soros α -DENV1 e α -DENV3 frente a este antígeno (figura 20 C).

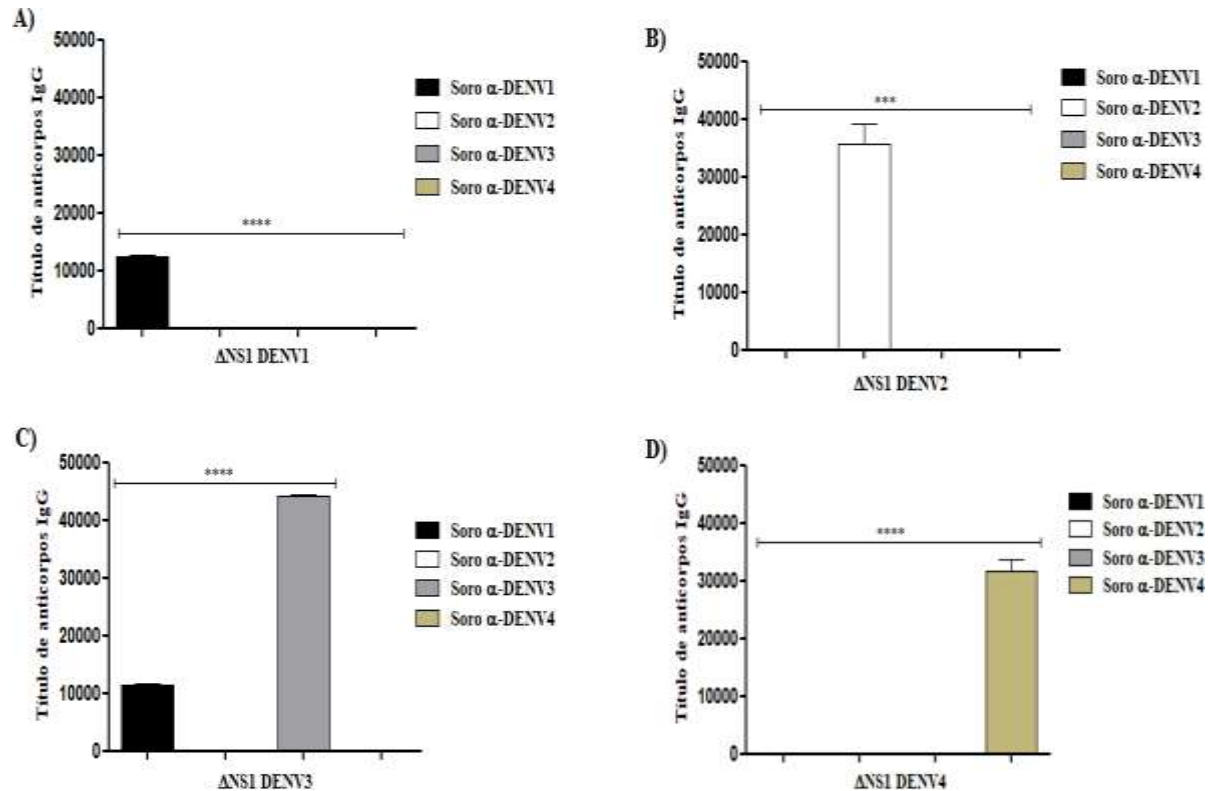


Figura 20 Validação das proteínas Δ NS1 dos DENVs como antígeno sorotipo-específico. As proteínas de cada um dos sorotipos foram utilizadas, isoladamente, como antígeno em ensaio de ELISA com a finalidade de avaliar a especificidade dos antígenos. A reatividade das proteínas foi avaliada frente às amostras de soros de todos os sorotipos normalizados para quantidades equivalentes de anticorpos antígeno específico. Descrição: (A, B, C e D) representam, respectivamente, o título de anticorpos IgG específicos a cada um dos antígenos. Os resultados correspondem à média de dois experimentos realizados em duplicata, em que **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$ e ns $p > 0,05$ (One-way ANOVA, com post-test Bonferroni's).

Após verificar a especificidade dos antígenos de interesse utilizando amostras de soro normalizadas para a mesma DO_{492} , investigamos a capacidade das Δ NS1 em identificar o sorotipo, utilizando amostras de soro murino diluídas em série, iniciando com a diluição 1:200. Os dados obtidos permitiram identificar que as Δ NS1 dos DENVs 1, 2 e 4 apresentaram os melhores resultados de especificidade, visto que esses antígenos apresentaram maior reatividade frente ao soro homólogo (figura 21 A, B e D). Assim como observado com as amostras de soros normalizados, foi identificada reatividade cruzada parcial entre anticorpos gerados com tipo 1 do vírus Dengue contra a proteína Δ NS1 do DENV3, confirmando os resultados descritos anteriormente (figura 21 C). A sorotipagem foi analisada também com as proteínas Δ NS1 desnaturadas termicamente, com as amostras de soro diluídas

de forma semelhante ao que foi descrito anteriormente. Os resultados demonstram que houve redução na reatividade das proteínas, mas não observamos diferenças no reconhecimento específico dos antígenos (figura 22 A-D).

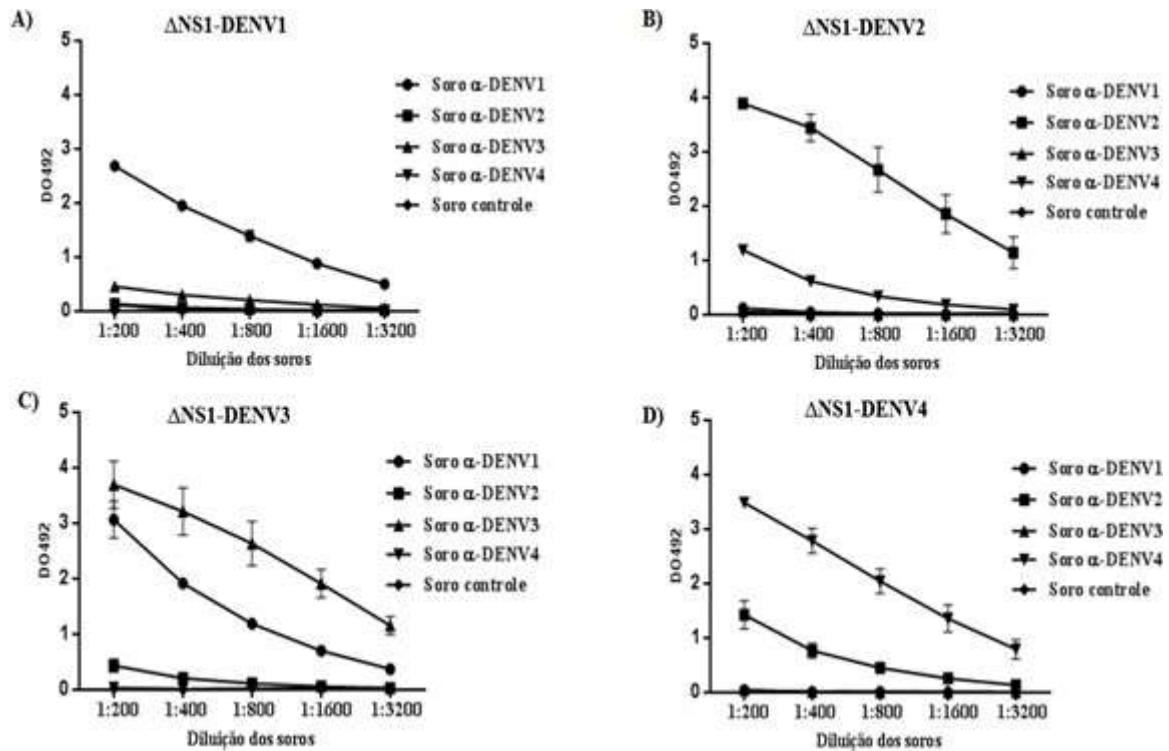


Figura 21 - Sorotipagem da infecção pelos DENVs com as proteínas Δ NS1. As proteínas recombinantes foram utilizadas separadamente como antígeno de fase sólida em ensaios de ELISA para identificação de infecções prévias (IgG) por cada um dos sorotipos DENVs, utilizando soro murino monoespecífico para cada um dos sorotipos, como controle utilizou-se soro negativo para infecção prévia por flavivírus. Descrição: (A, B, C e D) representam, respectivamente, o ensaio de sorotipagem com as proteínas Δ NS1 dos DENVs 1, 2, 3 e 4. Os resultados representam a média \pm erro padrão de dois ensaios realizados em duplicata.

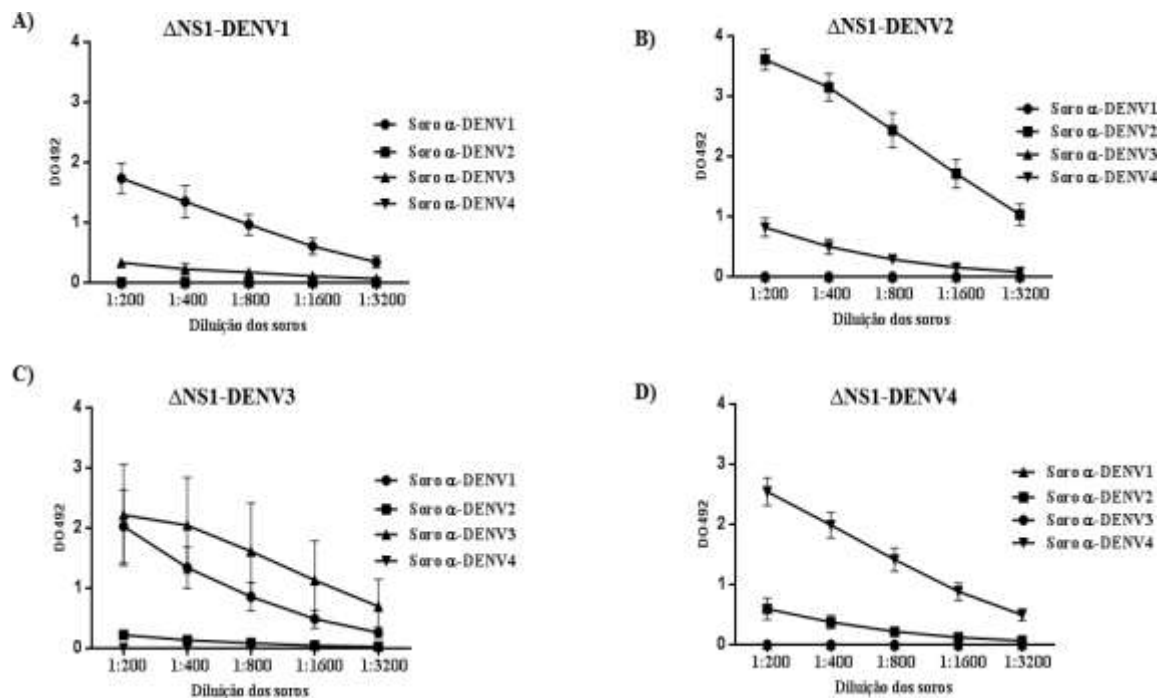


Figura 22 - Sorotipagem da infecção pelos DENVs com as proteínas Δ NS1 desnaturadas. As proteínas recombinantes foram desnaturadas termicamente e utilizadas como antígeno de fase sólida em ensaios de ELISA para identificação da infecção prévia por cada um dos DENVs utilizando soro murino monoespecífico para cada um dos sorotipos. Descrição: (A, B, C e D) representam, respectivamente, o ensaio de sorotipagem com as proteínas Δ NS1 dos DENVs 1, 2, 3 e 4. Os resultados representam a média \pm erro padrão de dois ensaios realizados em duplicata.

A fim de reduzir a reatividade cruzada da proteína Δ NS1 do DENV3 com o soro anti-DENV1, foram avaliadas duas condições alternativas de purificação do antígeno empregando tampões diferentes para a eluição da coluna (tampões CI e CII). Nas duas condições avaliadas os tampões atuam diretamente no dobramento das proteínas, contribuindo na redução de agregados e estabilidade do antígeno em solução o que poderia interferir na redução da detecção por anticorpos inespecíficos. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel e a pureza avaliada, permitindo a identificação da proteína de interesse com massa molecular esperada (\sim 16 kDa) e pureza adequada (figura 23 A e B). Após a confirmação da obtenção da Δ NS1 do DENV3, foi realizado ensaio de ELISA com os antígenos e amostras de soro α -DENV1 e α -DENV3, no entanto, não foram observadas diferenças na detecção específica dos antígenos (figura 23 C).

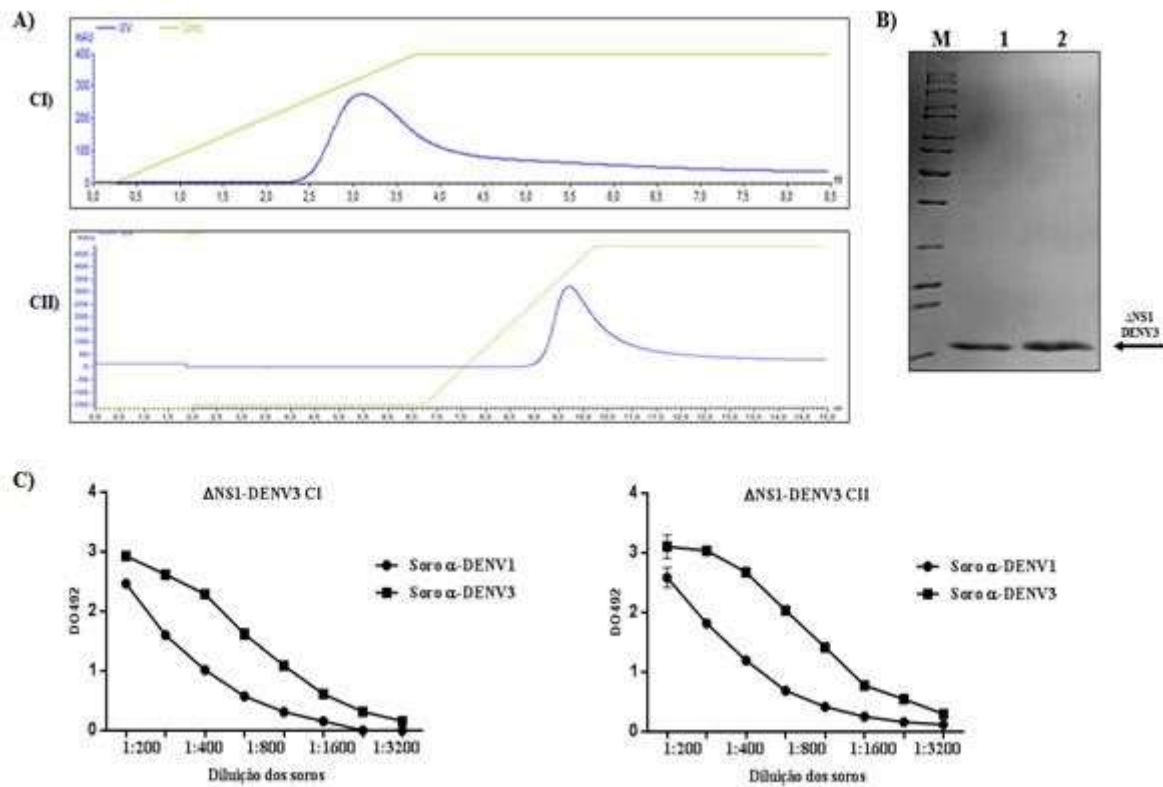


Figura 23 - Obtenção da proteína Δ NS1 do DENV3 para sorotipagem de infecção pelos DENVs. A proteína Δ NS1 do DENV3 foi purificada em duas condições para ser utilizada como antígeno de fase sólida, que possibilitasse a diferenciação de infecções prévias pelos DENVs 1 e 3. Descrição: (A) purificação da proteína Δ NS1 DENV3 nas condições (CI) contendo β -mercaptoetanol e (CII) contendo D-glicose, (B) avaliação da pureza das proteínas purificadas em gel de poliacrilamida a 15%, onde (1) proteína obtida na condição CI e (2) proteína da condição CII, (C) avaliação das proteínas em ensaio de ELISA para tipagem sorológica. Os resultados representam a média \pm erro padrão de um ensaio realizado em duplicata.

5 DISCUSSÃO

A dengue é uma das mais importantes infecções que atingem os seres humanos. Até o momento, não existem tratamento específico, vacinas eficazes, e os métodos de controle do vetor necessitam de melhor validação. Assim, o desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico seguro, acessível, específico, e que permitam a diferenciação dos sorotipos, proporcionando o monitoramento e controle dos casos de dengue deve ser explorado (42). No entanto, os testes sorológicos disponíveis apresentam comprometimento da especificidade, devido à reatividade cruzada com anticorpos resultantes da infecção por outras arboviroses que circulam em uma mesma área. A pesquisa por antígenos recombinantes purificados consiste em uma das principais prioridades para o desenvolvimento de testes sorológicos para arboviroses (19). Neste trabalho, avaliou-se a utilização de novos antígenos derivados da proteína NS1 dos DENVs (as Δ NS1 DENVs 1-4), para o diagnóstico de infecções prévias pelo vírus. Esses são antígenos recombinantes, com homologia da sequência de aminoácidos variável, o que pode ser interessante para o reconhecimento diferencial. Os antígenos foram obtidos conservando propriedades antigênicas, imunogênicas e, o mais importante, a especificidade frente às amostras de soro de animais previamente infectados pelo ZIKV e maior reconhecimento pelo sorotipo homólogo.

As proteínas de interesse foram obtidas como antígenos recombinantes em sistema procarioto na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3), uma das cepas de expressão mais utilizadas, pois é deficiente em proteases e capaz de expressar altos níveis de proteínas heterólogas. O uso de bactérias para expressão de antígenos representa uma alternativa de baixo custo, segura, rápida produção em larga escala, e quando comparado com outras plataformas, os rendimentos são inferiores apenas ao obtido por algumas espécies de leveduras (43,44). A obtenção destes antígenos em sistema procarioto apresenta vantagem em relação aos métodos utilizados nos testes de diagnóstico disponíveis nos serviços de saúde, que empregam, principalmente, partículas virais inativadas ou purificadas (ELISA IgG *Euroimmun*) ou mesmo antígenos derivados de células infectadas pelos DENVs (IgG e IgM MAC-ELISA).

Em seguida, examinamos variáveis diretamente envolvidas na solubilização das proteínas recombinantes durante a expressão. Em todas as condições avaliadas as Δ NS1 dos DENVs foram expressas, predominantemente, na fração insolúvel do extrato proteico. Esses achados não eram esperados, visto que a análise teórica do perfil de hidrofobicidade das proteínas demonstrou que as mesmas são constituídas, sobretudo, por regiões hidrofílicas.

Entretanto, sabe-se que apenas 20 a 30 % das proteínas produzidas em *E. coli* apresentam-se como solúveis, uma das principais justificativas para isso é a hiperexpressão em corpúsculos de inclusão (45). Nesse caso, a obtenção de proteínas na fração insolúvel tem como vantagens os altos níveis de expressão, usualmente, mais resistentes às proteases e com menor retenção de impurezas, facilitando as etapas de purificação (30).

A recuperação das proteínas insolúveis requer o uso de métodos de *refolding* para o enovelamento proteico, em nossa proposta adotamos a técnica de *refolding* por diluição pulsátil como estratégia de renaturação. Essa metodologia é amplamente validada e foi utilizada na purificação da NS1 do DENV2, que após o processo manteve antigenicidade e características estruturais (39,46). Ainda durante as etapas de *refolding* e purificação dos antígenos, outras variáveis devem ser consideradas com a finalidade de melhorar o rendimento. Por isso avaliamos a purificação das proteínas em tampões contendo diferentes concentrações de sal, visto que, como descrito na literatura, a força iônica disponível no meio exerce efeito no estágio de solubilização de proteínas (47). Os resultados obtidos foram concordantes com essa proposição, pois ao utilizar o tampão contendo 150 mM ou 300 mM de NaCl as proteínas apresentaram-se mais estáveis em solução, não sendo observados sinais de agregação. Os procedimentos de purificação mostram-se adequados para a obtenção das proteínas, visto que em análise eletroforética e imuno ensaio de *Western blotting* foi possível identificar a proteína com a massa molecular estimada e elevado grau de pureza. A eficiência das etapas de purificação foi confirmada também por ensaio de DLS, que permitiu identificar elevada homogeneidade estrutural, sendo indicativo de que as amostras analisadas eram constituídas em maior proporção por um único analito.

Após as etapas de expressão e purificação das proteínas é preciso avaliar se os epítomos conformacionais são mantidos, visto que eles são essenciais para o reconhecimento por anticorpos e demais componentes da resposta imune (39). Antígenos como partículas virais purificadas ou inativadas, que são usualmente encontrados em testes de diagnóstico, podem perder ou reduzir o reconhecimento por anticorpos produzidos após infecção natural, interferindo na sensibilidade dos ensaios. Por essa razão, avaliamos a antigenicidade das Δ NS1 dos DENVs e identificamos que todas as proteínas são reconhecidas pelos soros dos animais infectados pelos vírus. Além disso, quando avaliamos o reconhecimento dessas proteínas nas conformações íntegra ou desnaturada termicamente, observamos maior reatividade dos soros com as proteínas em sua conformação íntegra. Esses dados, em associação com as análises *in silico* de identificação de epítomos conformacionais, são

sugestivos de que os antígenos recombinantes purificados possuem epítomos conformacionais e que eles são mantidos depois da expressão e purificação.

A integridade dos antígenos purificados foi avaliada também quanto à imunogenicidade, utilizando protocolo de imunização com as proteínas em associação com o adjuvante LT1. O protocolo adotado revelou que as proteínas foram capazes de estimular resposta humoral com elevados títulos de anticorpos α - Δ NS1 após duas doses do inóculo, sendo indicativo de que a região da NS1 em estudo é capaz de gerar anticorpos após infecção pelos DENVs. Além disso, identificamos que os anticorpos α - Δ NS1 do DENV4 reconhecem a proteína NS1 nativa presente em células infectadas pelo vírus, demonstrando que a proteína possui características antigênicas muito semelhantes à NS1 nativa. Esses dados, combinados aos resultados da purificação e antigenicidade das Δ NS1, mostram que os antígenos obtidos apresentam qualidade esperada aos imunobiológicos de interesse diagnóstico.

Investigamos a cinética da resposta de anticorpos α - Δ NS1 e a detecção diferencial das proteínas NS1 DENV2 e a Δ NS1 DENV2. Os nossos resultados mostraram que após a infecção há uma resposta de anticorpos α - Δ NS1 robusta e de longa duração. A cinética da resposta humoral contra a NS1 ainda é pouco caracterizada, no entanto, sabe-se que essa proteína é imunogênica e está presente em elevadas concentrações na fase aguda, sendo responsável por alta resposta de anticorpos. Em um segundo momento, ao avaliarmos o reconhecimento diferencial da proteína inteira (NS1 DENV2) e do fragmento (Δ NS1 DENV2), observamos que as proteínas são detectadas de forma semelhante. A pesquisa por sítios imunogênicos localizados na NS1 dos DENVs tem permitido identificar regiões imunorreativas inseridas na porção C-terminal da proteína, entre elas o segmento que envolve os aminoácidos (aa) 261-275 (48). Outras propostas têm demonstrado que fragmentos (aa 296-325), também na região C-terminal, estão parcialmente expostos na superfície da NS1 em sua conformação dimérica, sendo passíveis de serem reconhecidos pelo sistema imunológico do indivíduo (49). Logo, as proteínas Δ NS1 seriam reconhecidas por anticorpos provenientes de infecção natural.

A confirmação da qualidade das proteínas recombinantes obtidas possibilitou analisar o uso delas como antígeno de fase sólida para detecção de anti-NS1 dengue IgG em plataforma de ELISA. O Ministério da Saúde do Brasil utiliza essa plataforma no diagnóstico de doenças como leptospirose, sífilis e infecções decorrente do HIV (vírus da Imunodeficiência Humana), e mesmo no diagnóstico de outras arboviroses como a febre amarela. Os ensaios de ELISA são simples, possuem custo acessível, e podem ser facilmente

implementados nos países em desenvolvimento. Além disso, a mesma estratégia utilizada no ELISA pode ser expandida para outras tecnologias como os testes rápidos (24). Nesse sentido, algumas propostas têm, tradicionalmente, utilizado a NS1 para detecção de infecções prévias pelos DENVs. No entanto, após a emergência de arboviroses como a zika, observou-se que existe resposta cruzada de anticorpos IgG anti-NS1 entre o ZIKV e o DENV (32). Assim, a especificidade desses testes deve ser reavaliada e novos antígenos derivados da NS1 pesquisados.

Em nosso trabalho, avaliamos a detecção das proteínas Δ NS1 em ensaio de ELISA por amostras de soros de animais infectados pelo ZIKV. Os resultados mostram que os antígenos, íntegros ou desnaturados, são específicos frente aos soros ZIKV avaliados, sendo observada reatividade cruzada parcial apenas com a Δ NS1 do DENV3 em relação a anticorpos gerados contra o DENV1. Uma possível justificativa para essa reatividade é a maior identidade da sequência de aminoácidos compartilhada entre esses dois vírus, quando comparado aos demais sorotipos do DENV (50). Visando reduzir o reconhecimento da Δ NS1 do DENV3 utilizamos os tratamentos com solução de ureia 6 M, que interfere em ligações químicas fracas, e a adsorção prévia do soro ZIKV com a Δ NS1 do ZIKV. Os resultados obtidos indicam a possibilidade de eliminar ou reduzir a reatividade cruzada, principalmente com a etapa de adsorção do soro teste com a Δ NS1 do ZIKV. Ressalta-se que é possível adaptar o protocolo empregando a ureia 6 M, pois já foi demonstrado que a solução interfere de forma eficiente em anticorpos de baixa afinidade, aumentando a especificidade dos testes (51). Mas, a baixa eficiência desse método em nosso estudo sugere que os anticorpos anti-ZIKV que reagem com a Δ NS1 do DENV3 são de alta afinidade, o que faz da etapa prévia de adsorção a melhor escolha para redução de reatividade cruzada.

Depois de avaliarmos a especificidade de cada um dos antígenos, examinamos se a combinação das Δ NS1 dos DENVs poderia ser utilizada no diagnóstico da dengue. Os resultados são indicativos de que essa é uma estratégia potencial para detecção de infecções prévias pelos DENVs. Interessantemente, nessa condição observamos ainda uma menor reatividade do soro ZIKV, possivelmente, devido à redução da massa da Δ NS1 do DENV3 utilizada no ensaio. A especificidade desses antígenos está em concordância com as informações disponíveis na literatura, que demonstraram a existência de epítomos na região C-terminal da NS1 específicos DENV. Além disso, tem-se obtido anticorpos monoclonais (anti-NS1) com reconhecimento específico da proteína de cada vírus, permitindo também a diferenciação entre as proteínas dos sorotipos dos DENVs (50). Evidências recentes têm

demonstrado que, mesmo a NS1 possuindo sítios conservados na sequência de aminoácidos e conteúdo estrutural, existem diferenças quanto à carga eletrostática entre a NS1 dos flavivírus (52). Essas diferenças podem ter implicações relevantes na estabilidade e dobramento das proteínas, assim como na interação da proteína com o anticorpo ou outro ligante.

A sensibilidade dos testes comerciais representa outro problema no diagnóstico da dengue, os valores para este parâmetro variam de 74-96%, ao se avaliar testes de ELISA disponíveis para detecção de IgG (28). Esses valores podem estar relacionados com a utilização de antígenos de má qualidade, reduzida imunogenicidade, ou mesmo, devido ao uso de antígeno de apenas um sorotipo. Assim, a utilização simultânea das proteínas dos DENV 1-4 permitindo a detecção dos quatro sorotipos aparece como uma estratégia promissora. Ainda nessa etapa, identificamos que a mistura das Δ NS1 foi reativa majoritariamente com amostra de paciente infectado previamente por DENV2, confirmando a antigenicidade das proteínas, agora, frente à amostra de soro humano. Os resultados abrem perspectivas para o desenvolvimento de *kit* de diagnóstico sorológico, para detecção de anticorpos IgG anti- Δ NS1 em infecções pelo DENV, sem a interferência de anticorpos IgG anti-NS1 ZIKV, e com sensibilidade adequada.

Além de avaliar o uso das proteínas Δ NS1 dos DENVs como antígenos no diagnóstico sorológico específico da dengue, investigamos também a capacidade dessas proteínas para determinação de cada um dos sorotipos. A identificação do sorotipo possui importância epidemiológica, sobretudo, no monitoramento da circulação dos sorotipos (53). Além disso, a detecção do sorotipo possui implicações no desenvolvimento de vacinas, sendo o teste para detecção de infecções pelo DENV recomendado pela Organização Mundial de Saúde previamente à administração da formulação vacinal do Instituto Pasteur Sanofi. Até o momento, as estratégias para identificação dos sorotipos são de custo elevado e restritas aos laboratórios de alta complexidade. Recentemente a ANVISA aprovou teste sorológico desenvolvido pela *Euroimmun* para detecção diferencial dos sorotipos dos DENVs, ZIKV e CHIKV, no entanto, o teste utiliza o método de imunofluorescência indireta para detectar anticorpos IgG ou IgM.

Para avaliar o uso das Δ NS1 na identificação dos sorotipos dos DENVs inicialmente examinamos a reatividade das proteínas frente às amostras de soros com as absorbâncias normalizadas em relação ao antígeno homólogo. Os resultados demonstram que nessa condição os antígenos dos quatro sorotipos apresentaram maior reatividade frente à amostra de soro homóloga ao antígeno testado. Quando avaliamos com as amostras de soro diluídas

1:200, foi identificado maior reconhecimento do sorotipo homólogo com as proteínas dos DENVs 1, 2 e 4. A variabilidade na sequência de aminoácidos, assim como a disposição diferente de epítomos conformacionais e sítios hidrofílicos podem estar associados a esses resultados.

Apenas a Δ NS1 do DENV3 apresentou reatividade cruzada e por isso avaliamos condições alternativas para obtenção do antígeno. No entanto, mesmo após as alterações nos protocolos de produção da proteína recombinante não obtivemos reconhecimento específico. É preciso explorar outras opções em substituição à Δ NS1 do DENV3, como o uso de peptídeos derivados desse fragmento ou outros antígenos do vírus, alguns grupos têm utilizado a estratégia baseada em peptídeos antigênicos e aplicá-los no diagnóstico da dengue (54). Os resultados aqui obtidos apresentam maior potencial do que o uso da NS1 inteira, visto que em trabalhos anteriores com esse antígeno não foi possível determinar o sorotipo devido à reatividade cruzada com as NS1 dos DENVs 1, 2 e 3 (24).

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que os antígenos obtidos apresentam enorme potencial para o diagnóstico sorológico da dengue. Em nossa proposta conseguimos as quatro proteínas recombinantes Δ NS1 dos DENVs íntegras, com elevado grau de pureza, antigenicidade e imunogenicidade preservadas. Essas proteínas foram reconhecidas de forma específica por soros obtidos após infecção primária pelos DENVs, sem interferência de anticorpos anti-NS1 IgG ZIKV. Além disso, identificamos que as Δ NS1 dos DENVs 1, 2 e 4 são, particularmente, de interesse para identificação do sorotipo do DENV. Esses resultados contribuem e abrem perspectiva para o desenvolvimento e validação de *kits* de diagnóstico sorológico específicos para a dengue.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos após execução do projeto permitem estabelecer as seguintes conclusões:

- 1) As proteínas recombinantes Δ NS1 dos DENVs foram expressas em sistema procarioto, sendo obtidas em sua forma solúvel, com elevado grau de pureza e rendimento considerável após as etapas de purificação;
- 2) As proteínas Δ NS1 foram reconhecidas por soros de animais infectados pelos DENVs, confirmando a antigenicidade dessas proteínas. Além disso, anticorpos anti- Δ NS1 do DENV4 foram capazes de reconhecer a NS1 em células Vero infectadas, demonstrando a semelhança entre os antígenos recombinante e as correspondentes proteínas nativas;
- 3) A combinação das proteínas recombinantes em ensaio de ELISA permitiu identificar de forma específica e sensível infecções prévias pelos quatro sorotipos do DENV sem a interferência de anticorpos produzidos após infecção pelo ZIKV;
- 4) As proteínas Δ NS1 dos DENVs 1, 2 e 4 apresentaram maior especificidade em relação ao reconhecimento pelo sorotipo homólogo.

Esses resultados comprovam a utilidade de novos antígenos recombinantes com elevado potencial para o diagnóstico específico da dengue, inclusive com a diferenciação entre os sorotipos. Desta forma, abrem-se perspectivas para o desenvolvimento de ensaios sorológicos diferenciais, acessíveis e de relevante impacto aos serviços de saúde pública.

REFERÊNCIAS*

1. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *N Engl J Med* [Internet]. Massachusetts Medical Society ; 2012 Apr 12 [cited 2018 Jan 4];366(15):1423–32. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1110265>
2. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Dec 1 [cited 2018 Jan 3];8(12):S7–16. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nrmicro2460>
3. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* [Internet]. 2012 Jun 19 [cited 2019 Apr 26];30(29):4301–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682286>
4. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2016 Aug 18 [cited 2019 Apr 26];2:16055. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27534439>
5. Organization WH. Dengue : Guidelines for Diagnosis Treatment Prevention and Control (New Edition 2009). [Internet]. World Health Organization; 2009 [cited 2019 Apr 26]. 158 p. Available from: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=dlc0YSIyGYwC&oi=fnd&pg=PP2&dq=dengue+guidelines+WHO+2009&ots=ONyXGE3Nn6&sig=AVI1yz19j3gMadK0zEG_XTi6Pnk#v=onepage&q=dengue+guidelines+WHO+2009&f=false
6. Murray NEA, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol* [Internet]. Dove Press; 2013 [cited 2018 Jan 3];5:299–309. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990732>
7. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Apr 7 [cited 2018 Jan 3];496(7446):504–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nature12060>
8. Epidemiológico B, Editorial Wanderson Kleber de Oliveira C, Buosi Rohlfs D, Marques Macário E, Duarte E, Fernando Mendes Pereira G, et al. Apresentação. [cited 2019 Apr 26]; Available from: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/21/2019-006.pdf>
9. Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Elsevier; 2017 Mar 1 [cited 2018 Jan 19];17(3):e88–100. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330991630473X>
10. Melino S, Paci M. Progress for dengue virus diseases. *FEBS J* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2007 Jun 1 [cited 2018 Jan 5];274(12):2986–3002. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2007.05831.x>
11. Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 Apr 18 [cited 2018 Jan 6];23(5):456–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nsmb.3213>

12. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier; 2003 May 1 [cited 2018 Jan 7];3(1):19–28. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134803000042>
13. OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborío S, et al. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Sci Transl Med* [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 2011 Dec 21 [cited 2018 Jan 7];3(114):114ra128. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22190239>
14. Diamond MS, Pierson TC. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell* [Internet]. Cell Press; 2015 Jul 30 [cited 2018 Jan 8];162(3):488–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867415008429>
15. Muller DA, Depelseñaire ACI, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis* [Internet]. Oxford University Press; 2017 Mar 1 [cited 2018 Jan 8];215(suppl_2):S89–95. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiw649>
16. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2005 Jan 1 [cited 2018 Jan 7];3(1):13–22. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1067>
17. Zhang B, Salieb-Beugelaar GB, Nigo MM, Weidmann M, Hunziker P. Diagnosing dengue virus infection: rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2015 Oct [cited 2019 Apr 26];11(7):1745–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26093055>
18. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2018 Jan 20];8(12):S30–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2459>
19. dos Santos FB, Miagostovich MP, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Riley LW, Harris E. Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2004 Aug [cited 2019 May 1];71(2):144–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306702>
20. Wahala WMPB, de Silva AM. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses* [Internet]. 2011 Nov 25 [cited 2019 Feb 25];3(12):2374–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22355444>
21. Cedillo-Barrón L, García-Cordero J, Bustos-Arriaga J, León-Juárez M, Gutiérrez-Castañeda B. Antibody response to dengue virus. *Microbes Infect* [Internet]. Elsevier Masson; 2014 Sep 1 [cited 2019 Feb 25];16(9):711–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457914000987>
22. Nascimento EJM, George JK, Velasco M, Bonaparte MI, Zheng L, DiazGranados CA, et al. Development of an anti-dengue NS1 IgG ELISA to evaluate exposure to dengue virus. *J Virol Methods* [Internet]. 2018 Jul [cited 2019 Apr 26];257:48–57. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29567514>
23. Cedillo-Barrón L, García-Cordero J, Bustos-Arriaga J, León-Juárez M, Gutiérrez-Castañeda B. Antibody response to dengue virus. *Microbes Infect* [Internet]. 2014 Sep [cited 2019 Apr 26];16(9):711–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25124542>
 24. Tyson J, Tsai W-Y, Tsai J-J, Brites C, Mässgård L, Ha Youn H, et al. Combination of Nonstructural Protein 1-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Can Detect and Distinguish Various Dengue Virus and Zika Virus Infections. *J Clin Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology Journals; 2019 Feb 1 [cited 2019 Apr 26];57(2):e01464-18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30429254>
 25. Mardekian SK, Roberts AL. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *Biomed Res Int* [Internet]. Hindawi; 2015 Oct 5 [cited 2019 Apr 27];2015:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/834371/>
 26. Normas SA, Técnicos M. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue [Internet]. 2009 [cited 2019 Apr 26]. Available from: <http://www.saude.gov.br/bvs>
 27. Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017 Mar [cited 2019 Apr 26];17(3):e88–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185868>
 28. Rodriguez-Manzano J, Po &, Chia Y, Tsin &, Yeo W, Holmes A, et al. Improving Dengue Diagnostics and Management Through Innovative Technology. 1908 [cited 2019 Apr 27]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0633-x>
 29. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* [Internet]. Elsevier; 2013 May 1 [cited 2018 Feb 18];98(2):192–208. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354213000624>
 30. Das D, Mongkolaungkoon S, Suresh MR. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. *Protein Expr Purif* [Internet]. Academic Press; 2009 Jul 1 [cited 2018 Feb 13];66(1):66–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592809000333>
 31. Muller DA, Landsberg MJ, Bletchly C, Rothnagel R, Waddington L, Hankamer B, et al. Structure of the dengue virus glycoprotein non-structural protein 1 by electron microscopy and single-particle analysis. *J Gen Virol* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2018 Jun 6];93(Pt_4):771–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238236>
 32. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 2017 Aug 1 [cited 2018 May 6];114(31):8384–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28716913>
 33. Röltgen K, Rose N, Ruggieri A, Warryn L, Scherr N, Pinho-Nascimento CA, et al. Development of Dengue Virus Serotype-Specific NS1 Capture Assays for the Rapid and Highly Sensitive Identification of the Infecting Serotype in Human Sera. *J Immunol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2019 Apr 27];200(11):3857–66. Available from:

- <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1701790>
34. Wattal C, Datta S. Dengue NS1 antigen detection: A useful tool in early diagnosis of dengue virus infection. *Indian J Med Microbiol* [Internet]. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd.; 2010 [cited 2019 Apr 27];28(2):107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404453>
 35. Castro MC, Wilson ME, Bloom DE. Disease and economic burdens of dengue. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Elsevier; 2017 Mar 1 [cited 2018 Jan 6];17(3):e70–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330991630545X>
 36. Suaya J, Shepard D, Beatty M. Dengue burden of disease and cost of illness. WHO Scientific Working Group: Report on Dengue Vol. 2007 [cited 2019 Apr 27]; Available from: https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Dengue+burden+of+disease+and+cost+of+illness.+WHO+Scientific+Working+Group%3A+Report+on+Dengue+Vol&btnG=
 37. Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* [Internet]. 1986 Sep 23 [cited 2019 Apr 26];25(19):5425–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2430611>
 38. Ansari H, Raghava GP. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res* [Internet]. 2010 Oct 20 [cited 2019 Apr 26];6(1):6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961417>
 39. Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods* [Internet]. Elsevier; 2010 Aug 1 [cited 2017 Dec 24];167(2):186–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093410001321>
 40. Cunha M dos P, Guimarães VN, Souza M, de Paula Cardoso D das D, de Almeida TNV, de Oliveira TS, et al. Phylodynamics of DENV-1 reveals the spatiotemporal co-circulation of two distinct lineages in 2013 and multiple introductions of dengue virus in Goiás, Brazil. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2016 Sep [cited 2019 Apr 26];43:130–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27223633>
 41. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam A V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 1992 [cited 2019 Apr 26];30(3):545. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265106/>
 42. Dutra NR, de Paula MB, de Oliveira MD, de Oliveira LL, De Paula SO. The laboratorial diagnosis of dengue: applications and implications. *J Glob Infect Dis* [Internet]. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2009 Jan [cited 2019 Apr 29];1(1):38–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300385>
 43. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier; 2009 May 1 [cited 2018 May 29];27(3):297–306. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009000202>

44. Desai PN, Shrivastava N, Padh H. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier; 2010 Jul 1 [cited 2018 May 29];28(4):427–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975010000194>
45. Renaud Vincentelli, Christophe Bignon *, Arnaud Gruez, Stephane Canaan, Gerlind Sulzenbacher, Mariella Tegoni, et al. Medium-Scale Structural Genomics: Strategies for Protein Expression and Crystallization. *American Chemical Society* ; 2003 [cited 2018 May 29]; Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar010130s>
46. Allonso D, da Silva Rosa M, Coelho DR, da Costa SM, Nogueira RMR, Bozza FA, et al. Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. *J Virol Methods* [Internet]. Elsevier; 2011 Jul 1 [cited 2018 Jun 1];175(1):109–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093411001674>
47. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier; 2005 Jan 31 [cited 2018 Jun 1];289(1–2):1–30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517304006908>
48. Chen Y, Pan Y, Guo Y, Qiu L, Ding X, Che X. Comprehensive mapping of immunodominant and conserved serotype- and group-specific B-cell epitopes of nonstructural protein 1 from dengue virus type 1. *Virology* [Internet]. 2010 Mar 15 [cited 2018 Jun 3];398(2):290–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20079511>
49. Hertz T, Beatty PR, MacMillen Z, Killingbeck SS, Wang C, Harris E. Antibody Epitopes Identified in Critical Regions of Dengue Virus Nonstructural 1 Protein in Mouse Vaccination and Natural Human Infections. *J Immunol* [Internet]. 2017 May 15 [cited 2018 Jun 3];198(10):4025–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381638>
50. Freire MCLC, Pol-Fachin L, Coêlho DF, Viana IFT, Magalhães T, Cordeiro MT, et al. Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses. *ACS Omega* [Internet]. American Chemical Society; 2017 Jul 31 [cited 2018 Jun 3];2(7):3913–20. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.7b00608>
51. SUMITA LM, RODRIGUES JP, FERREIRA NE, FELIX AC, SOUZA NCS, MACHADO CM, et al. DETECTION OF HUMAN ANTI-ZIKA VIRUS IgG BY ELISA USING AN ANTIGEN FROM *in vitro* INFECTED VERO CELLS: PRELIMINARY RESULTS. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 30];58(0). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652016005000270&lng=en&tlng=en
52. Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 May 18 [cited 2018 Jun 6];23(5):456–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/nsmb.3213>
53. Shu P-Y, Huang J-H. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. American Society for Microbiology; 2004 Jul 1 [cited 2019 Apr 30];11(4):642–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242935>

54. Rai R, Dubey S, Santosh KV, Biswas A, Mehrotra V, Rao DN. Design and synthesis of multiple antigenic peptides and their application for dengue diagnosis. *Biologicals* [Internet]. Academic Press; 2017 Sep 1 [cited 2019 May 1];49:81–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105617301008>