

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

Klécia Marília Soares de Melo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE INSUMOS PARA DIAGNÓSTICO DE
INFECÇÕES PELO VÍRUS DA DENGUE**

RECIFE

2012

KLÉCIA MARÍLIA SOARES DE MELO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE INSUMOS PARA DIAGNÓSTICO DE
INFECÇÕES PELO VÍRUS DA DENGUE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Rafael Dhalia

Co-orientadores: Ernesto T. A. Marques Jr.

Roberto Dias Lins Neto

RECIFE

2012

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

M528d Melo, Klécia Marília Soares de.
Desenvolvimento e validação de insumos para diagnóstico de infecções pelo vírus da dengue / Klécia Marília Soares de Melo. - Recife: s.n, 2012.
178, ilus.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2012

Orientadores: Rafael Dhalia; co-orientadores: Ernesto Torres Marques Júnior, Roberto Dias Lins Neto.

1. Dengue - diagnóstico. 2. Vírus da dengue. - imunologia. 3. Proteínas Virais - imunologia. I. Dhalia, Rafael. II. Marques Júnior, Ernesto Torres. III. Lins Neto, Roberto Dias. IV. Título.

CDU 616.98:578.833.2

KLÉCIA MARÍLIA SOARES DE MELO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE INSUMOS PARA DIAGNÓSTICO DE
INFECÇÕES PELO VÍRUS DA DENGUE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovada em: ___ / ___ / _____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rafael Dhalia
(Orientador)
CPqAM/FIOCRUZ-PE

Dr. Ernesto T. A. Marques Jr.
(Titular Interno)
CPqAM/FIOCRUZ-PE

Dra. Marli Tenório Cordeiro da Silva
(Titular Externo)
LACEN; CPqAM/FIOCRUZ-PE

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva
(Suplente Interno)
CPqAM/FIOCRUZ-PE

Dr. Roberto Dias Lins Neto
(Suplente Externo)
DQF-UFPE

AGRADECIMENTOS

“Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem concentração e auto-sacrifício, esforço e dúvida.” Max Beerbohm

Agradeço aos que suportaram minhas ausências, minhas incertezas, minhas saudades. Agradeço aos que cultivaram o amor à ciência em mim. Aos que me desafiaram. Aos que me motivaram, me fizeram ser melhor. Aos que me deram crédito e enxergaram oportunidades maiores que as que eu podia imaginar.

Entre estes, meu querido orientador Rafael Dhalia, que cuidou da minha formação com tanta atenção e me proporcionou oportunidade de crescimento pessoal e profissional das mais diversas formas. A ele e ao Dr. Ernesto Marques, tenho imensa gratidão pela confiança, apoio, ideias, suporte técnico e intelectual. Ao Dr. Roberto Lins, por me mostrar o quanto mais além de uma bancada eu posso ir, e por despertar o interesse pela junção entre a ciência teórica e experimental em meus próximos trabalhos.

Aos colegas e amigos de laboratório, no LaViTE – FIOCRUZ (Doris, Renato, Gabriel, Heike, Georgia, Sandra, Jefferson, José Valter, Clintiano, Verônica, Kenya, Ana Maria, Janaína, Diégina, Amanda, Mayara, Telissa, Dr. Laura, Dr. Bartolomeu, Dra. Marli, Dr. Renato, Dr. André, e aos eternos “Laviteanos” Sabrina, Thiego, Fábila, Mariana e Andréa Rangel), no LQTC – UFPE (Fred, Gabriel, Agrinaldo, Rafael, Marcos, Daniela, Vitor, Dra. Tereza) e no CVR - *University of Pittsburgh* (Eduardo, Bruno, Kazima, Tom, Nicholas, Sophie, Nishang, Jeff) agradeço pela troca de experiências, suporte e momentos de descontração.

Aos meus irmãos por escolha, Bruna Mazulo, Isabelle Viana e Rafael Silva. Meus companheiros de todas as horas, científicas ou não. Vocês ultrapassaram a fronteira da amizade, vocês são a parte da vida que eu nunca quero perder. Por vocês eu cruzaria o continente. Basta pedir.

Aos amigos da graduação, minhas lindas onzetas: Chará, Elis, Amanda e Aline, Amanda Teixeira, Rayanna, Raíssa, Elga, Darlene e Taciana. Aos amigos da turma do mestrado, especialmente Jana Sandes e Amanda Aliança.

Aos meus companheiros de imigração, Wagner (coleguinha), Mariana Andrade (“pareia”) e temporariamente Wladi Figueiredo. Foi imensamente importante ter um pedaço de casa perto de mim, pessoas com quem me expressar não envolvia as infundáveis limitações das diferenças linguísticas. Por me ouvirem falar sem parar em alto e bom português por horas a fio.

A Alan Twaddle, que me ensinou tanta coisa e me ajudou de tantas maneiras. Teve tanta paciência com minhas loucuras, com meu “*brazilian way of life*”. Agradeço por ter partilhado comigo sua experiência, sua cultura, seu mundo, e por ter se esforçado tanto pra me fazer sentir em casa. Eu realmente me senti assim. Existem certas coisas que tempo e distância não mudam.

Aos meus pais, sempre comigo, sempre confiando nas minhas decisões e apoiando meus sonhos que cada vez me levam para mais longe. A saudade de vocês sempre vai ser enorme, mas como ouvi certa vez, o que vocês me deram, os ensinamentos, a moral, a vontade de buscar o que almejo, isso tudo que aprendi com vocês, não importa em que parte do mundo eu esteja, eu vou levar sempre comigo.

Minha irmãzinha linda, minha metade, minha flor, de quem morro de saudade sempre e em quem penso todos os dias. A você quero agradecer por ter me mostrado o quanto mais além dos livros eu posso ser. Por se esforçar tanto para me fazer mais menina, mais mimada, mais Klecianne. Te amo, linda. A Victor, o melhor cunhado que alguém pode ter, por tornar os fins de semana em casa sempre tão divertidos. E a Leo, por ter entrado nas nossas vidas para ocupar o lugar que sempre foi dele.

À minha família, em especial a Amanda e Rafaela, mais amigas que primas.

A Deus, por me proporcionar tudo que tenho, por me segurar quando o medo era grande, a estrada desconhecida e o futuro assustador. Por ter feito todas as coisas da maneira mais perfeita que elas poderiam acontecer. Por cuidar de mim sempre, e me dar discernimento, perseverança, e a convivência e amizade de todas as pessoas acima citadas, que fazem eu ser quem eu sou, feliz como sou.

Agradeço ao suporte financeiro deste projeto, em especial à Fundação Oswaldo Cruz, onde este projeto foi iniciado, mais especificamente ao Departamento de Virologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife-PE, ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS), ao Dr. Marco Krieger, Dr. Ernesto Marques e Leonardo Foti pelo suporte na aquisição dos antígenos comerciais e síntese química das sequências utilizadas neste trabalho, à Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE). Agradeço à *University of Pittsburgh (Center for Vaccine Research)*, Pennsylvania, Estados Unidos, onde foi realizada grande parte experimental deste trabalho, e ao *Fogarty International Center - National Institutes of Health (Global Infectious Diseases Research Training Program grant, D43TW006592)*, pelo financiamento, e ao Dr. Lee Harrison pelo suporte e oportunidade.

MELO, Klécia Marília Soares de. **Desenvolvimento e validação de insumos para diagnóstico de infecções pelo vírus da dengue**. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

RESUMO

A dengue é uma doença causada por um flavivírus, representado por quatro sorotipos distintos (DENV1-4). Entre as proteínas virais, ENV e NS1 contribuem fortemente com o processo de resposta imune desencadeado pelo vírus. Os principais sistemas de diagnóstico utilizam a detecção de anticorpos através da técnica *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA, a qual, embora útil, apresenta inúmeras limitações (custo, tempo de processamento, entre outros). Neste trabalho, nós desenvolvemos ensaios *multiplex* de microarranjos líquidos para ENV e NS1. Sequências de aminoácidos codificantes das proteínas, provenientes de cepas isoladas da América Latina foram selecionadas em bancos de dados públicos, alinhadas para a geração das respectivas sequências consenso e construção dos antígenos recombinantes. As sequências obtidas foram otimizadas para expressão bacteriana, submetidas à síntese comercial e clonadas em vetores de expressão procarióticos. Os antígenos foram expressos e validados através de ensaios de microarranjos líquidos, com obtenção de promissores resultados, especialmente para as proteínas ENV (domínios I/II) sorotipo 1 e 2, com potencial aplicação comercial. Este trabalho desenvolveu ainda metodologia para renaturação de NS1 com excelente rendimento. Os resultados das proteínas produzidas neste trabalho foram de forma geral superiores aos obtidos por antígenos comercialmente disponíveis para a proteína ENV de dengue vírus, utilizando a mesma metodologia. As proteínas NS1 foram ainda utilizadas para imunização de coelhos e produção de anticorpos policlonais, que se mostraram bem sucedidos para aplicações em ensaios de imunofluorescência, *western blot*, citometria de fluxo e como anticorpo de detecção para ensaios quantitativos para a proteína NS1 por ELISA de captura. Os resultados obtidos neste projeto foram considerados extremamente promissores, com potencial aproveitamento no desenvolvimento de testes diagnósticos comerciais com alta precisão, rápidos e com baixo custo.

Palavras-chave: Dengue; Proteínas Virais; Diagnóstico.

MELO, Klécia Marília Soares de. **Production and validation of diagnostic inputs for dengue virus infections.** 2012. Dissertation (Public Health Master degree) - Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2012.

ABSTRACT

Dengue is one disease caused by a flavivirus, represented by four distinct serotypes (DENV1-4). Among the viral proteins ENV and NS1 strongly contribute to the process of immune response triggered by the virus. The major diagnostic systems used today are based on the detection of antibodies by the Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - ELISA, which, have several limitations (cost and processing time, between others). In this work, we developed liquid microarray multiplex assays for the ENV and NS1 proteins. Amino acid sequences encoding the proteins from Latin America isolated strains were selected from public databases and aligned to generate the respective consensus sequences and construction of recombinant antigens. The sequences were optimized for bacterial expression, subject to commercial synthesis and cloned into prokaryotic expression vectors. The antigens were expressed and validated by liquid microarray assays, obtaining promising results, especially for ENV proteins (domains I/II), serotype 1 and 2, with potential commercial application. This study developed a methodology for refolding of NS1 with excellent yield. The results of this study were in general superior to those obtained with commercially available antigens for the ENV protein of Dengue virus, using the same methodology. The NS1 protein has been used to immunization of rabbits and production of polyclonal antibodies, with proved successful recognition of NS1 proteins in immunofluorescence assays, Western blot, flow cytometry and as detection antibody for quantitative NS1 assays by capture ELISA. The results of this project were considered extremely promising, with potential use in the development of commercial diagnostic tests with high precision, fast and low cost.

Keywords: Dengue; Viral proteins; Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mosquitos pertencentes ao genero <i>Aedes</i> , envolvidos com a transmissão do vírus DENV.	22
Figura 2 - Distribuição geográfica de casos de dengue (clássica e hemorrágica) antes e após 1960.	23
Figura 3 - Países ou áreas de risco para dengue no mundo.	24
Figura 4 - Evolução da população de <i>Aedes aegypti</i> nas Américas como consequência do Programa de Erradicação da Febre Amarela.	25
Figura 5 - Sorotipos de dengue isolados no Brasil por Unidade Federativa (UF), de janeiro - agosto de 2011.	27
Figura 6 - Casos notificados de dengue de acordo com a semana de início dos sintomas por região do Brasil, 2010 e 2011.	27
Figura 7 - Municípios infestados por <i>Aedes aegypti</i> , no Brasil, em 1995.	28
Figura 8 - Municípios infestados por <i>Aedes aegypti</i> , no Brasil, em 2006.	29
Figura 9 - Estrutura superficial de DENV.	31
Figura 10 - Representação esquemática do genoma de DENV.	32
Figura 11 - Representação esquemática da contribuição de cada proteína viral para a resposta imunológica do hospedeiro humano à infecção por DENV.	34
Figura 12 - Estrutura da vacina quimérica contra a dengue da iniciativa Sanofi Pasteur.	36
Figura 13 - Resposta imunológica à infecção por DENV.	37
Figura 14 - Representação esquemática do vetor pRSETA.	46
Quadro 1 - Diversos kits de diagnóstico, comercialmente disponíveis no mercado, para detecção de anticorpos anti-DENV.	64
Figura 15 - Esquema representativo da estratégia de clonagem desenvolvida para flanquear os genes sintéticos.	65
Figura 16 - Otimização de <i>codon usage</i> para o aminoácido leucina na sequência ENV sorotipo 1.	68
Figura 17 - Otimização de <i>codon usage</i> para o aminoácido alanina da sequência NS1 sorotipo 1.	69
Figura 18 - Otimização de estrutura secundária de RNAm para a sequência ENV sorotipo 3.	70
Figura 19 - Otimização de estrutura secundária de RNAm para a sequência DENV NS1 sorotipo 1.	70

Figura 20 - Otimização gênica para a quantidade e distribuição de GC na sequência de DNA da proteína DENV ENV sorotipo 4.....	71
Figura 21 - Otimização gênica para a quantidade e distribuição de GC na sequência de DNA da proteína DENV NS1 sorotipo 4.....	72
Figura 22 - Linearização do vetor pRSETA com as enzimas <i>Nhe</i> I e <i>Nco</i> I.....	73
Figura 23 - Extração plasmidial dos vetores pUC57 recebidos da empresa GenScript.....	74
Figura 24 - Clivagem dos genes sintéticos da sequência ENV (sorotipo 1 a 3), a partir do vetor comercial pUC57.....	74
Figura 25 - Clivagem dos genes sintéticos da sequência NS1 (sorotipo 1 a 4), a partir do vetor comercial pUC57.....	75
Figura 26 - Extração de DNA plasmidial e provas de clivagem interna para DENV ENV sorotipo 4.....	75
Figura 27 - Teste de solubilidade das proteínas DENV NS1 após indução com IPTG.....	77
Figura 28 - Indução da expressão da proteína DENV NS1 sorotipo 3 em pequena escala para selecionar clones com melhores níveis de expressão.....	78
Figura 29 - Ensaio de expressão em pequena escala para proteína DENV ENV sorotipo 1....	78
Figura 30 - Esquema representativo da sequência da proteína ENV de dengue vírus representada por seus domínios funcionais.....	79
Figura 31 - Clivagem enzimática dos plasmídeos comerciais DENV ENV sorotipo 1 e 2.....	80
Figura 32. Prova de clivagem de DENV ENV sorotipo 1 e 2 no vetor pRSETA.....	81
Quadro 2 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados para amplificar os domínios I e II do gene DENV ENV 3.....	81
Figura 33 - Amplificação da sequência gênica do domínio I e II do gene DENV ENV sorotipo 3, através de PCR.....	82
Figura 34 - Teste de solubilidade das proteínas DENV ENV truncadas sorotipo 1 e 2, após indução com IPTG.....	83
Figura 35 - Quantificação da proteína Envelope (domínios I/II), do vírus DENV sorotipo 2.....	83
Figura 36 - Proteínas DENV NS1 (sorotipo 1 a 4) após purificação em resina de níquel ativada.....	84
Figura 37 - Dicroísmo circular das proteínas NS1-ASB, após renaturação.....	88
Figura 38 - Purificação do anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente.....	90
Figura 39 - <i>Western blot</i> das proteínas DENV NS1 desnaturadas.....	91
Figura 40 - <i>Western blot</i> das proteínas DENV NS1-ASB após renaturação.....	92
Figura 41 - <i>Western blot</i> das proteínas DENV NS1-rec após renaturação.....	93

Figura 42 - Curva de titulação do anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente produzido em coelho usado como anticorpo de detecção para a proteína DENV NS1.....	94
Figura 43 - Curva de detecção para o antígeno DENV NS1 dos quatro sorotipos virais através de ELISA de captura.....	95
Figura 44 - Curvas de detecção para o antígeno DENV NS1, geradas individualmente para cada sorotipo viral, através de ELISA de captura.	96
Figura 45 - Quantificação da proteína NS1 por ELISA de captura de amostras concentradas 3:1 de sobrenadantes de cultura de células infectadas com DENV.....	97
Figura 46 - Imunofluorescência indireta para DENV em células C6/36 utilizando o anticorpo anti-dengue NS1 policlonal produzido em coelho.	99
Figura 47 - Controles negativos para imunofluorescência indireta para DENV em células Vero usando os anticorpos anti-dengue NS1 tetravalente e 2H2.	100
Figura 48 - Imunofluorescência indireta para DENV em células Vero usando os anticorpos anti-dengue NS1 tetravalente e 2H2.....	101
Figura 49 - Citometria de fluxo para células HepG2 infectadas e não-infectadas, realizando marcação intracelular com os anticorpos 2H2 e anti-dengue NS1 policlonal tetravalente. ...	103
Figura 50 - Citometria de fluxo para células HepG2 infectadas e não-infectadas, realizando marcação intracelular com os anticorpos controles de isotipo.	103
Figura 51 - Avaliação dos antígenos DENV NS1-rec em termos de especificidade e sensibilidade através de ensaios de microarranjos líquidos.....	107
Figura 52 - Avaliação dos antígenos DENV NS1-ASB em termos de especificidade e sensibilidade através de ensaios de microarranjos líquidos.....	108
Figura 53 - Comparação entre as curvas ROC dos antígenos DENV NS1-rec e NS1-ASB separados por método de renaturação.....	110
Figura 54 - Comparação entre as curvas ROC dos antígenos DENV NS1-rec e NS1-ASB separados por sorotipo viral.....	111
Figura 55 - Avaliação do desempenho dos antígenos DENV ENV (domínios I/II) sorotipo 1 e 2 através da curva ROC.....	113
Figura 56 - Comparação entre as curvas ROC das proteínas DENV ENV (domínios I/II) sorotipo 1 e 2.	114
Figura 57 - Avaliação dos antígenos DENV ENV completos comerciais (Prospec), em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos.....	117
Figura 58 - Avaliação do antígeno DENV ENV sorotipo 2 completo comercial (MyBiosource), em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de	

microarranjos líquidos e comparação das curvas ROC de todos os antígenos DENV ENV completos.....	118
Figura 59 - Comparação entre as curvas ROC das proteínas DENV ENV (domínios I/II) ..	122
Figura 60. Avaliação do desempenho comparativo dos antígenos DENV ENV (domínio I/II) através da curva ROC.	121
Figura 61 - Comparação entre as curvas ROC das proteínas DENV ENV domínio III - Prospec.....	124
Figura 62 - Avaliação dos antígenos DENV ENV (domínio III) - Prospec, em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos.....	124
Figura 63 - Avaliação dos antígenos DENV ENV quiméricos – parte I (Prospec), em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos.	127
Figura 64 - Avaliação dos antígenos DENV ENV quiméricos – parte II (Prospec), em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos.	128
Figura 65 - Comparação entre as curvas ROC das proteínas DENV ENV quiméricas.	129
Figura 66 - Comparação entre as curvas ROC das proteínas DENV ENV quiméricas DEN-009 e DEN-010 com as proteínas DENV ENV (domínios I/II) <i>in house</i> , sorotipos 1 e 2.....	130
Figura 67 - Avaliação dos antígenos DENV, ENV e NS1, em microesferas tetravalentes, em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos.....	132
Figura 68 - Comparação entre as curvas ROC dos antígenos DENV, ENV e NS1, acoplados às microesferas tetravalentes.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantificação da concentração das proteínas recombinantes DENV ENV e NS1, e do rendimento protéico total das expressões em <i>E. coli</i> BL21 <i>Star</i>	85
Tabela 2 - Quantificação das proteínas recombinantes DENV NS1-rec e NS1-ASB após o processo de renaturação e cálculo do rendimento protéico total dos diferentes métodos.....	86
Tabela 3 - Valores de concentração (em $\mu\text{g/ml}$) de proteína NS1 obtido em sobrenadantes de cultura testados por ELISA de captura.	98
Tabela 4 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV NS1 após renaturação.....	109
Tabela 5 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV (domínios I/II) sorotipo 1 e 2... ..	114
Tabela 6 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV comerciais completos.....	119
Tabela 7 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV truncados (domínios I/II, MyBiosource)... ..	122
Tabela 8 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV (domínio III) - Prospec	125
Tabela 9 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV quiméricos.....	127
Tabela 10 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV e NS1 em microesferas tetravalentes (tetra).....	133
Tabela 11 - Análise estatística da performance dos antígenos, produzidos neste trabalho e adquiridos comercialmente, em ensaios de microarranjos líquidos.	134
Tabela 12 - Análise estatística para estabelecimento de classificadores, por grupos de proteínas, analisadas simultaneamente.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acre
ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i> , Aumento dependente de anticorpo
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
AM	Amazonas
AMP	Ampicilina
ATG	Adenina-timina-guanina
AUC	<i>Area under curve</i> , área sob a curva
BSA	Albumina sérica bovina
C	Citosina
C-	Controle negativo
C6/36	Células de <i>Aedes albopictus</i> , clone C6/36
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAP	Capsídeo (proteína)
CD	Dicroísmo circular
CDC	<i>Centers for Diseases Control</i> , Centros para Controle de Doenças
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação
CID	coagulação intravascular disseminada
CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisas com seres humanos
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DC	Dengue clássica
DENV	Dengue vírus
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida
EDTA	Etileno-diamino-tetra-acetato
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , Ensaio imunoadsorvente enzima-ligado
ENV	Proteína envelope
FA17D	Cepa vacinal febre amarela 17D
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , classificação de células ativada por

	fluorescência
FC	Fixação do complemento
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FI	Fração insolúvel
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fração solúvel
G	Guanina
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , proteína verde fluorescente
h	Hora
His	Histidina
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IH	Inibição da hemaglutinação
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactosídeo
KCl	Cloreto de potássio
kDa	kiloDaltons
kHz	Kilohertz
L15	Meio Leibowitz-15
LaViTE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
LB	Meio Luria Bertani
M	molar
MAC-ELISA	ELISA de captura de Imunoglobulina M
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> , Meio essencial mínimo
MFI	Intensidade de fluorescência média
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Centro Nacional para

	Informação Biotecnológica
NTA	ácido nitrilotriacético
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NS	<i>Non-structural</i> , Não-estrutural
NS1	Proteína Não-estrutural 1
NS1-ASB	Proteína NS1 renaturada com detergente ASB (ALLONSO <i>et al.</i> , 2011)
NS1-rec	Proteína NS1 renaturada com metodologia desenvolvida neste trabalho
nt	Nucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i> , Fase de leitura aberta
pb	Pares de base
PBS	Solução fostato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
prM	Proteína pré-membrana
Proteína M	Proteína de Membrana
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RBS	<i>Ribosome Binding Site</i> , Sítio de ligação do ribossomo
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _t	RNA transportador
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> , Curva da Característica Operativa do Receptor
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcription polimerase chain reaction</i> , transcrição reversa acoplada a reação em cadeia da polimerase
SCD	Síndrome do choque da dengue
SE	Semana epidemiológica
seg	segundo
SFB	Soro fetal bovino
SIB	<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i> , Instituto Suíço de Bioinformática
Sulfo-NHS	Sulfo-N-hidroxisuccinimida

SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TMB	3,3',5,5' -tetrametilbenzidina
Tris-HCl	Tris-ácido clorídrico
U	Unidade
UF	Unidade federativa
UTR	<i>Untranslated region</i> , região não-traduzida
UV	Ultravioleta
VVR	<i>Virus Variation Resources</i>
YF	Vírus da febre amarela
YFV-17DD	Cepa vacinal contra o vírus da febre amarela
μl	Microlitro
+ssRNA	+ <i>single strain</i> RNA, fita simples de RNA polaridade positiva
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
2H2	Anticorpo anti-Dengue <i>Virus Complex</i> , clone D3-2H2-9-21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Dengue: situação epidemiológica	21
1.1.1 Histórico e situação epidemiológica mundial.....	21
1.1.2 Dengue no Brasil	24
1.2 Aspectos clínicos da infecção por DENV	29
1.3 Agente etiológico	30
1.3.1 Estrutura e genoma viral.....	31
1.3.2 Proteínas virais	32
1.4 Prevenção e tratamento	34
1.5 Diagnóstico laboratorial	36
1.5.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA	39
1.5.2 Microarranjos Líquidos.....	40
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Seleção de sequências e construção dos antígenos quiméricos	44
4.2 Otimização e síntese das sequências de DNA para expressão em células procarióticas	44
4.3 Construção dos vetores de expressão	45
4.3.1 Preparação de células competentes.....	45
4.3.2 Preparação do vetor de expressão pRSETA (Invitrogen).....	45
4.3.3 Preparação dos vetores contendo os genes otimizados	47
4.3.4 Subclonagem dos genes otimizados no vetor pRSETA de expressão bacteriana	48
4.4 Expressão e ensaio de solubilidade da proteína expressa	48
4.5 Purificação protéica por cromatografia de afinidade – protocolo desnaturante	49
4.6 Renaturação das proteínas NS1 purificadas com o protocolo desnaturante	50
4.7 Análises de dicroísmo circular (<i>Circular Dichroism</i>, CD) das proteínas NS1 pós-renaturação	51
4.8 Produção de anticorpos tetravalentes contra as proteínas NS1 completas	52

4.9 Purificação de anticorpos tetravalentes contra as proteínas NS1 completas e avaliação da resposta imunológica	53
4.10 Aplicações para os anticorpos policlonais anti-NS1 tetravalentes	53
4.10.1 <i>Western blot</i>	54
4.10.2 Elisa de captura para proteína NS1.....	54
4.10.3 Imunofluorescência indireta.....	56
4.10.4 Citometria de fluxo para identificação de células infectadas através de marcação intracitoplasmática de proteínas de DENV.....	58
4.11 Validação da imunogenicidade dos antígenos recombinantes através da técnica de microarranjos líquidos	60
4.12 Coorte sorológica	62
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	63
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6.1 Seleção das sequências e construção dos antígenos recombinantes	64
6.2 Otimização e síntese das sequências de DNA para expressão em células procarióticas	67
6.3 Construção dos vetores de expressão	73
6.3.1 Preparação do vetor de expressão.....	73
6.3.2 Preparação dos genes sintéticos para subclonagens no vetor de expressão pRSETA.....	73
6.4 Expressão e purificação e renaturação das proteínas recombinantes	76
6.4.1 Expressão e purificação das proteínas DENV ENV e NS1.....	76
6.4.2 Renaturação das proteínas recombinantes DENV NS1.....	85
6.5 Análise de dicroísmo circular (CD) das proteínas NS1 pós-renaturação	87
6.6 Produção e purificação de anticorpos anti-dengue NS1 policlonais tetravalentes	89
6.6 Avaliação da sensibilidade e especificidade dos anticorpos específicos contra as proteínas DENV NS1	90
6.6.1 <i>Western blot</i>	90
6.6.2 Ensaio ELISA de captura para a proteína DENV NS1.....	93
6.6.2 Imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente.....	99
6.6.3 Citometria de fluxo.....	102
6.7 Ensaio de microarranjos líquidos	104
6.7.1 Proteínas DENV NS1.....	105
6.7.2 Proteínas DENV ENV (domínios I/II).....	112

6.7.3 Proteínas comerciais para dengue.....	115
6.7.3.1 Proteínas DENV ENV completas sorotipos 1 a 4 (Prospec) e DENV ENV completa sorotipo 2 (MyBiosource)	115
6.7.3.2 Proteínas ENV truncadas (domínios I/II)-MyBiosource.....	119
6.7.3.3 Proteínas ENV truncadas - domínio III (Prospec)	122
6.7.3.4 Proteínas DENV ENV quiméricas (Prospec)	125
6.7.4 Microesferas tetravalentes	130
6.8 Classificadores.....	134
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	135
Referências	137
APÊNDICE A: RELATÓRIO DE OTIMIZAÇÃO DO GENE DENV NS1 SOROTIPO 1.	159
ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	173
ANEXO B: PARECER DO COMITÊ NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISAS COM SERES HUMANOS	175

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue: situação epidemiológica

1.1.1 Histórico e situação epidemiológica mundial

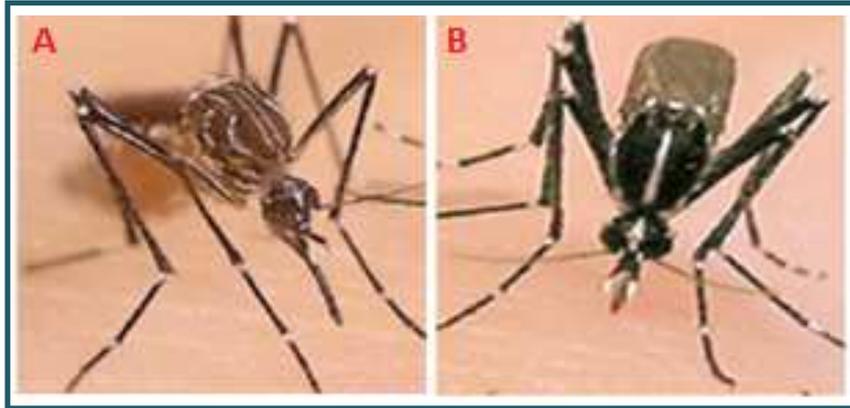
O vírus Dengue (DENV) é o agente causador da dengue, atualmente um dos mais importantes desafios para a saúde pública mundial entre as doenças emergentes. A palavra dengue tem origem espanhola e quer dizer melindre, manha, uma referência ao estado de moleza e prostração que o indivíduo fica submetido ao ser infectado (BRASIL, 2010).

Embora a dengue seja uma doença antiga, nas últimas décadas o mundo tem visto um aumento sem precedentes na sua distribuição geográfica, incidência e gravidade da infecção. O vírus infecta milhões de pessoas anualmente e a doença é endêmica em muitas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, gerando grande ônus para os sistemas de saúde. Ainda não estão disponíveis vacinas preventivas eficazes, terapêutica etiológica ou quimioprofilaxia efetivas específicas para este vírus (ARAÚJO, 2009).

Nesse ínterim, diversas iniciativas de pesquisa estão sendo realizadas visando a compreensão da virologia molecular e celular, genômica e evolução viral (ENDY *et al.*, 2010).

A dengue é uma doença infecciosa aguda, descrita hoje como a principal arbovirose tropical em termos de morbidade e mortalidade. É transmitida pela picada de fêmeas infectadas de mosquitos hematófagos dos gêneros *Aedes*, principalmente pelas espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (figura 1) (RODHAIN; ROSEN, 1997), sendo considerada a doença de transmissão vetorial com o maior crescimento no mundo (MACIEL *et al.*, 2008).

Figura 1 - Mosquitos pertencentes ao genero *Aedes*, envolvidos com a transmissão do vírus DENV.



Fonte: Centers for Diseases Control (2012a).

Nota: O vírus é transmitido para o ser humano através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Aedes*. Em A: *Aedes aegypti*. Em B: *Aedes albopictus*.

As primeiras notificações de epidemias de dengue ocorreram em 1779 no Cairo (Egito) e em Jacarta (Indonésia), registradas por David Bylon e August Hirsch. No ano seguinte, na Filadélfia foi observada uma doença similar, que foi denominada febre quebra-ossos (RUSH, 1789; SILER *et al.*, 1926). Durante quase 200 anos a dengue foi considerada benigna e não-fatal. Em 1903, Graham apontou a importância do *Aedes aegypti* na transmissão do agente, o que foi confirmado anos depois (CHANDLER; RICE, 1923; CLELAND *et al.*, 1919) e, em 1907, Ashburn e Craig reconheceram a etiologia viral da febre clássica da dengue.

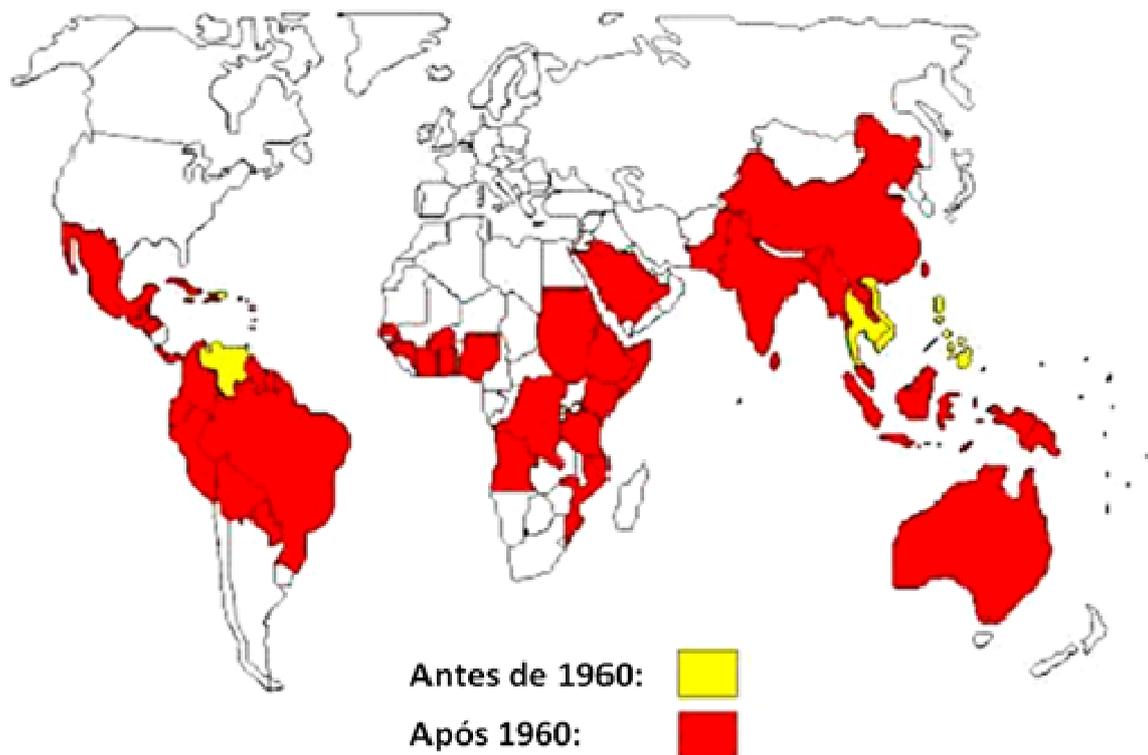
O isolamento de DENV só ocorreu na década de 1940, por Kimura em 1943 e Hotta em 1944, sendo a cepa isolada denominada Mochizuki. Em 1945, Sabin e Schlesinger isolaram a cepa *Hawaii*. No mesmo ano, Sabin identificou outro vírus em Nova Guiné, e observou que as cepas tinham características antigênicas diferentes entre si, sendo consideradas sorotipos distintos do mesmo vírus. Às primeiras cepas ele denominou sorotipo 1, e a da Nova Guiné, sorotipo 2 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Em 1956, no curso da epidemia de dengue hemorrágica no Sudeste Asiático foram isolados os sorotipos 3 e 4 (MARTINEZ-TORRES, 1990). Formou-se então o complexo dengue, formado por quatro sorotipos, atualmente designados: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, pertencentes à família *Flaviviridae*.

Os longos intervalos entre os surtos epidêmicos iniciais (em torno de 10 a 40 anos) foram analisados pelos pesquisadores dos Centers for Disease Control and Prevention (CDC) como consequência da dificuldade de deslocamento das populações e do mosquito vetor (CENTERS FOR DISEASES CONTROL, 2007).

As grandes epidemias de dengue tiveram início no sudeste Asiático durante e após a Segunda Guerra Mundial, nas décadas de 1940 e 1950, e se expandiram para o resto do

mundo nas décadas posteriores (PINHEIRO; NELSON, 1997), principalmente devido às mudanças ocorridas no mundo pós-Segunda Guerra Mundial, onde se criou o ambiente ideal para o rápido aumento populacional e a maior distribuição do mosquito vetor, deixando novas populações susceptíveis ao contato com o vírus (OOI *et al.*, 2010), conforme visto na figura 2.

Figura 2 - Distribuição geográfica de casos de dengue (clássica e hemorrágica) antes e após 1960.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2012).

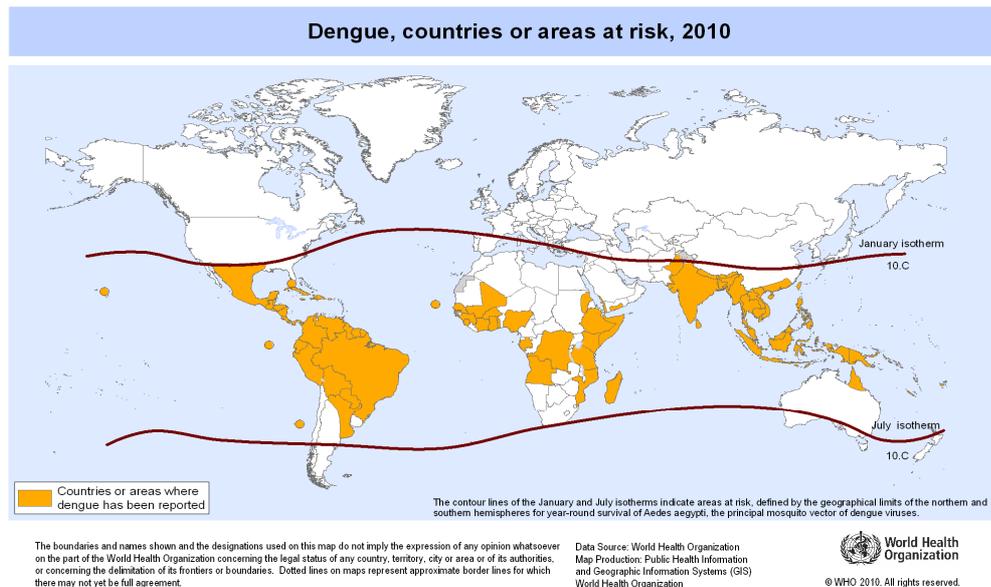
Nota: Devido às mudanças ocorridas após a Segunda Guerra Mundial, à maior distribuição do mosquito vetor e ao aumento da população mundial, juntamente com a facilidade de locomoção ao redor do mundo, ocorreu um aumento impactante nas populações susceptíveis ao contato com o mosquito infectado com o vírus.

A incidência de dengue em todo o mundo aumentou dramaticamente nas últimas décadas (CENTERS FOR DISEASES CONTROL, 2011). Juntamente com o aumento das áreas infestadas com o vetor, aumentou o número de regiões onde ocorre a transmissão da doença e o número de pessoas susceptíveis. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, hoje, a dengue se distribui em uma larga faixa abaixo e acima do Equador, 35° Norte a 35° Sul, e aproximadamente três bilhões de pessoas vivem nas áreas de risco de contrair dengue. Dentre os milhões de casos de dengue clássica (DC) - em torno de 100 milhões, anualmente, cerca de 500 mil evoluem para os quadros graves da Febre Hemorrágica da

Dengue (FHD)/Síndrome do Choque da Dengue (SCD), sendo notificados anualmente cerca de 22 mil óbitos, principalmente em crianças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

A figura 3 mostra os dados da Organização Mundial da Saúde, durante o ano de 2010, das regiões do mundo onde há circulação viral, e onde casos da doença foram notificados.

Figura 3 - Países ou áreas de risco para dengue no mundo.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2011a).

Nota: Em amarelo, regiões onde a doença tem sido registrada.

Atualmente, a doença é endêmica em mais de 100 países, estando presente em áreas urbanas e suburbanas nas Américas, sudeste da Ásia, Pacífico ocidental e Mediterrâneo oriental e áreas rurais da África (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011b). Com as mudanças climáticas globais, novos países como Austrália e Estados Unidos podem ter, em breve, quadros endêmicos de dengue (LUPI, 2011). É importante ressaltar também que nas florestas tropicais da Ásia e África já foi relatada a ocorrência do ciclo silvestre, no qual o vírus é transmitido entre primatas não-humanos (SILVA *et al.*, 1999; RODHAIN, 1991).

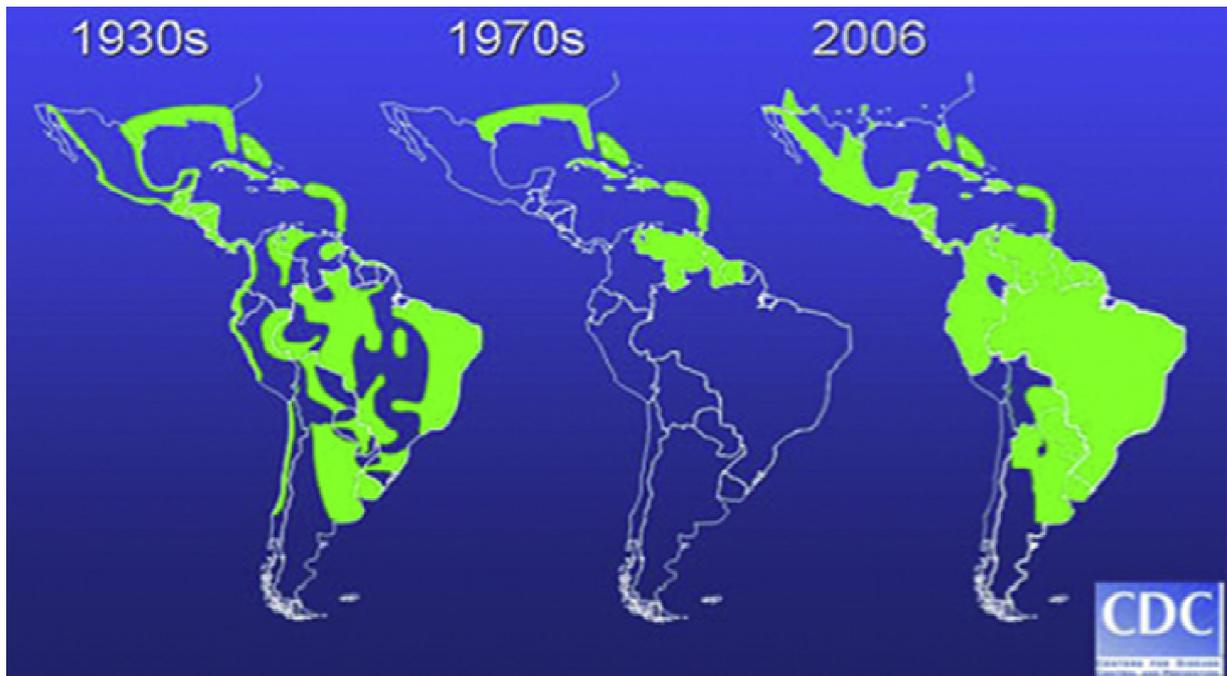
1.1.2 Dengue no Brasil

Nas Américas, durante os anos 1950 e 1960, casos de dengue eram raros devido à iniciativa de erradicação do *A. aegypti* pelo Programa de Erradicação da Febre Amarela, desenvolvido pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (GUBLER, 1989; GLUBER, 1997). Com a interrupção do programa no início dos anos setenta, as décadas de

oitenta e noventa presenciaram a reinfestação do vetor nos países dos quais tinha sido potencialmente erradicado. Em 1997, o mosquito havia atingido uma distribuição geográfica maior que a existente antes do programa de erradicação (ROSS, 2010) e, com o aumento da área infestada pelo vetor, houve consequente aumento no número de casos de dengue (figura 4).

A reinfestação criou o elo básico da cadeia epidemiológica para a introdução do vírus no Brasil (TAUIL, 2002). A primeira epidemia, documentada clínica e laboratorialmente em território nacional ocorreu em 1981 e 1982 no estado de Roraima, causada pelos sorotipos DENV1 e DENV4, no entanto a doença foi circunscrita a esta área (OSANAI, 1984).

quência do Programa de

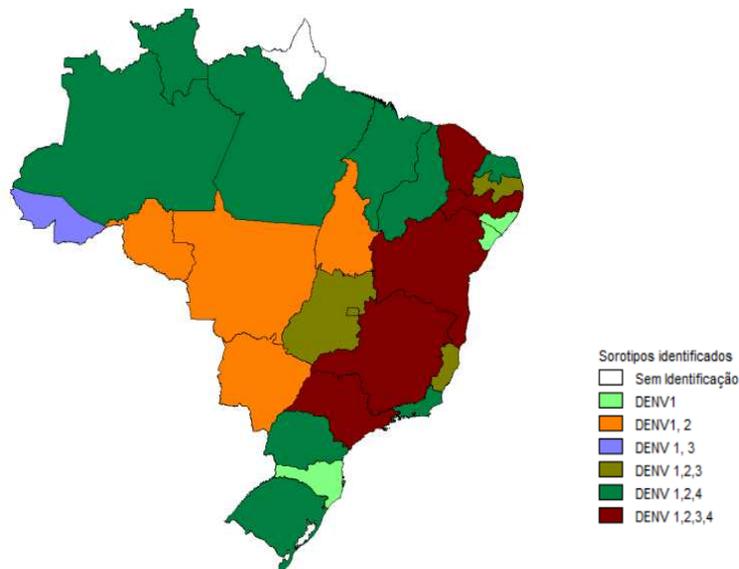


rante a década de 1970, a
 ções de onde tinha sido
 e.

Após um silêncio epidemiológico, o sorotipo DENV1 invadiu o Sudeste (Rio de Janeiro) e Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais) entre os anos de 1986 e 1987 (DONALÍSIO, 1999; SCHATZMAYR *et al.*, 1986), de onde se espalhou pelo país. Os primeiros casos de dengue pelo sorotipo 2 aconteceram em 1990 no Rio de Janeiro, Tocantins e Alagoas (NOGUEIRA *et al.*, 1991) enquanto os de DENV3 ocorreram em 2001, também no Rio de Janeiro, disseminando-se posteriormente para outros estados (NOGUEIRA

et al., 2001). Em 2002, ocorreu a maior epidemia causada por DENV3, com 794.013 casos notificados, sendo 2.707 casos de FHD, com 150 óbitos (BRASIL, 2003). Desde a década de 1980, não eram reportados casos de infecção por DENV4 como casos autóctones no território nacional. Após 28 anos, em 2010, a Secretaria de Saúde de Roraima notificou à Secretaria de Vigilância em Saúde um caso suspeito de dengue pelo sorotipo viral DENV4, autóctone de Boa Vista, capital do estado. O caso foi confirmado pelas técnicas de transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase (*reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) e isolamento viral e, desde então, inúmeros outros casos foram notificados em várias regiões do país (BRASIL, 2010), e o vírus DENV4 foi isolado a partir de amostras suspeitas principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste, como visto na figura 5.

Figura 5 - Sorotipos de dengue isolados no Brasil por Unidade Federativa (UF), de janeiro - agosto de 2011.



Fonte: Brasil (2011).

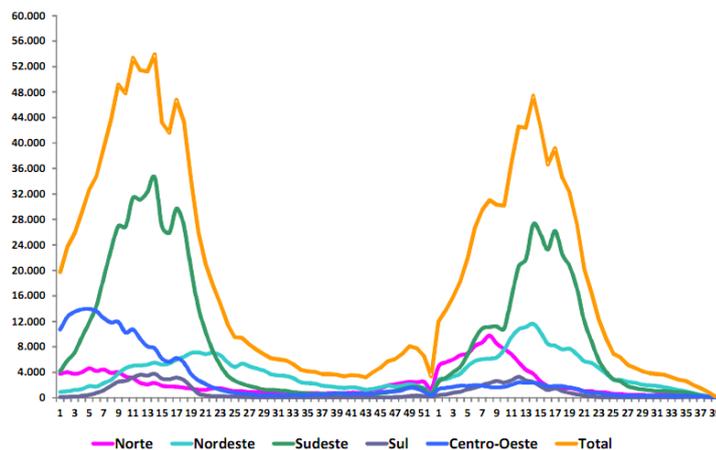
Nota: A figura mostra o resultado das inoculações para isolamento e identificação viral, por estados e sorotipos isolados. Em 2011, foram inoculadas 17.416 amostras, com uma taxa de positividade de 31.1%. De modo geral, houve um predomínio marcado do sorotipo 1, isolado em 86,1% das amostras positivas.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, em 2007 o Brasil notificou cerca de 60% dos 900 mil casos de dengue nas Américas, destacando o impacto dessa doença em território nacional e a importância do Brasil no cenário mundial da doença. A dengue encontra-se hoje presente em todos os 27 estados da Federação (BRASIL, 2005), distribuída por 3.794 municípios (PIMENTA Jr, 2005). No período de 1990 a 2006, foram registrados 6.272 casos de FHD, principalmente em adultos com a ocorrência de 386 óbitos (BRASIL, 2009).

No ano de 2011, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS) registrou um total de 721.546 casos de dengue no país, excluindo os descartados, até a semana epidemiológica (SE) 39 (25/09 a 01/10/11). A Região Sudeste teve o maior número de casos (343.731 casos; 47,6%), seguida da Região Nordeste (184.663 casos; 25,6%), Norte (113.638 casos; 15,7%), Centro-Oeste (44.552 casos; 6,2%) e Sul (34.962 casos; 4,8%). Aproximadamente 54,4% (392.696) dos casos do país concentraram-se em quatro estados: Rio de Janeiro (155.771; 21,6%), São Paulo (113.204; 15,7%), Amazonas (61.224; 8,7%) e Ceará (62.497; 8,5%) (BRASIL, 2011).

Na Região Norte, os municípios de Manaus (AM) e Rio Branco (AC) apresentaram os maiores números de casos notificados, com 53.668 e 16.677 casos, respectivamente. Esses dois municípios foram responsáveis por 62% dos casos notificados na região (BRASIL, 2011). A figura 6 apresenta os casos de dengue entre a SE 01 (03 a 09/01) de 2010 até a SE 39 de 2011 no Brasil, de acordo com as regiões do país. Observa-se tendência de aumento no número de casos a partir do início do ano de 2011 (SE 01) em todas as regiões e uma redução sustentada a partir da SE 08 (20 a 26/02) no Norte e SE 14 (03 a 09/04) no Nordeste e Sudeste do país. A taxa de letalidade por dengue para o período no país foi de 6,1%, considerando a totalidade dos óbitos e casos graves notificados.

Figura 5 - Casos notificados de dengue de acordo com a semana de início dos sintomas por região do Brasil, 2010 e 2011.



Fonte: Brasil (2011).

Nota: A figura mostra a flutuação de casos de dengue nas diferentes regiões do país, durante os anos de 2010 e 2011, agrupados por SE.

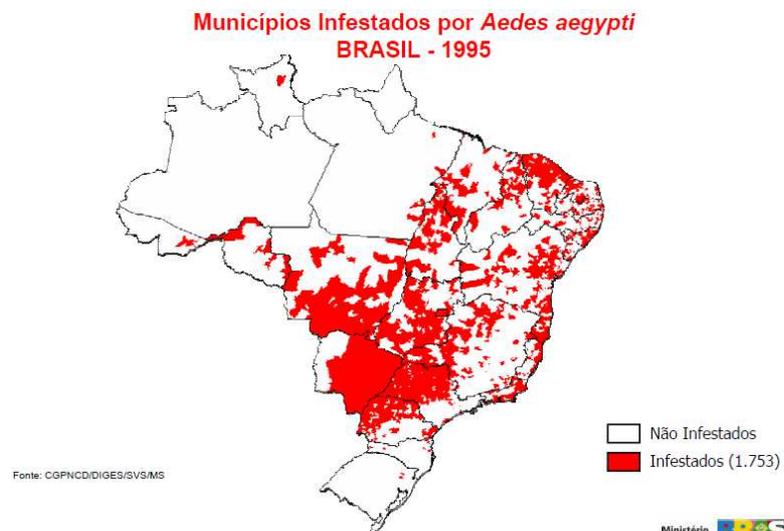
O aumento de ocorrência da dengue tem se constituído de um crescente objeto de preocupação para a sociedade e, em especial, para as autoridades de saúde, em razão das dificuldades enfrentadas para o controle das epidemias produzidas por esse vírus e pela

necessidade de ampliação da capacidade instalada dos serviços de saúde para atendimento aos indivíduos acometidos com formas graves, em especial a FHD (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Kurane e Ennis (1992) defendem que os casos relatados de dengue são a ponta do *iceberg* que envolve a infecção pelo vírus, uma vez que menos que 10% dos casos de dengue sintomáticos são relatados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000). Diante deste quadro, os números já alarmantes das epidemias de dengue no Brasil estariam na verdade subestimados, e o problema seria bem maior.

As características clínicas e epidemiológicas peculiares da dengue no Brasil têm despertado o interesse de pesquisadores e organismos nacionais e internacionais de saúde pública, tendo em vista a importância da identificação dos fatores que determinam as distintas formas de expressão individual e coletiva dessas infecções para o aperfeiçoamento do seu tratamento e controle. A dengue é hoje objeto da maior campanha de saúde pública do Brasil, que se concentra no controle do *Aedes aegypti*, único vetor reconhecido como transmissor do vírus dengue em nosso meio (CÂMARA *et al.*, 2007). O *A. aegypti* é um inseto intimamente associado com os seres humanos e suas habitações. Nesse ambiente, o mosquito encontra não apenas a fonte para os repastos sanguíneos, mas também os recipientes com água dentro e próximo às residências, necessários para que o mosquito complete seu desenvolvimento. No Brasil o mosquito encontra-se altamente adaptado e a área infestada está em expansão (figuras 7 e 8).

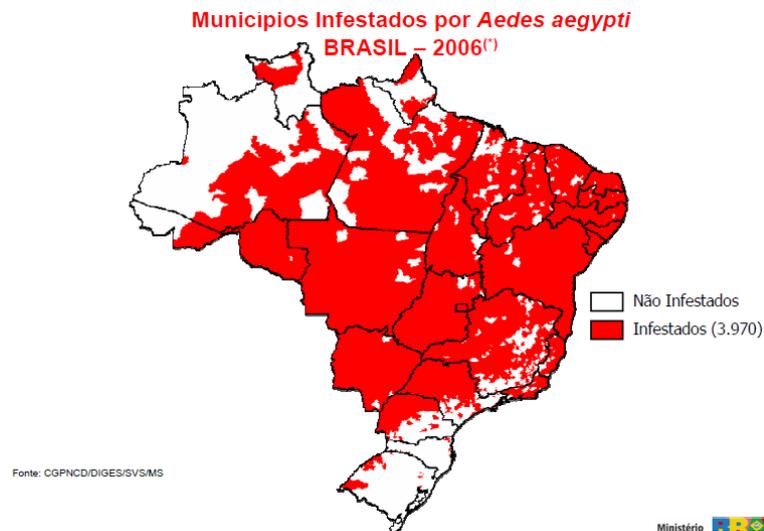
Figura 6 - Municípios infestados por *Aedes aegypti*, no Brasil, em 1995.



Fonte: Brasil (2012).

Nota: Em vermelho, as regiões infestadas por *Aedes aegypti* no território brasileiro. Em branco, as regiões classificadas como não infestadas.

Figura 7 - Municípios infestados por *Aedes aegypti*, no Brasil, em 2006.



Fonte: Brasil (2012).

Nota: Em vermelho, as regiões infestadas por *Aedes aegypti* no território brasileiro. Em branco, as regiões classificadas como não infestadas.

1.2 Aspectos clínicos da infecção por DENV

O homem, os primatas não-humanos e mosquitos do gênero *Aedes* são os hospedeiros naturais do DENV, porém o homem é o único a desenvolver a forma clínica da doença. Indivíduos de todas as raças e idades podem ser infectados (LUPI, 2011).

O espectro clínico da dengue é muito amplo, variando desde quadros assintomáticos/oligossintomáticos até formas hemorrágicas mais graves, por vezes fatais. Na maioria das vezes, as pessoas infectadas pelos vírus não apresentam quaisquer manifestações clínicas. O percentual de infecções assintomáticas pode variar de 26% a cerca de 56% (CUNHA *et al.*, 1995; VASCONCELOS *et al.*, 1993) e está relacionado a fatores ambientais, individuais do hospedeiro, do vetor e do próprio vírus.

O quadro clínico da DC constitui uma doença febril indiferenciada, auto-limitada, embora debilitante, que envolve sintomas como febre alta de início abrupto, seguida de cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retro-orbital, exantema e prurido cutâneo. Manifestações gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarréias podem ocorrer, bem como linfadenopatias. A febre persiste, em média, por cinco a sete dias (GUZMÁN; KOURI, 2002).

Em alguns casos, a infecção pode provocar uma enfermidade grave, por vezes fatal, a FHD/SCD. A FHD apresenta-se com uma febre de início súbito, que é acompanhada de uma

variedade de sinais e sintomas similares àqueles da DC, podendo durar de dois a sete dias. O agravamento deste quadro ocorre através de manifestações hemorrágicas devido ao aumento da permeabilidade capilar, hemoconcentração, trombocitopenia e colapso circulatório, culminando com o choque hipovolêmico (SINGHI *et al.*, 2007). A mortalidade varia de 5% a 50%, sendo em média de 12% (LUPI *et al.*, 2007). A apresentação clínica da dengue hemorrágica é bastante similar à dengue clássica, o que destaca a importância de um diagnóstico precoce para monitoramento dos casos. O paciente em choque hipovolêmico não-tratado adequadamente pode evoluir com acidose metabólica e graves sangramentos gastrointestinais e em outros órgãos, podendo o paciente evoluir para o óbito em 12 a 24 horas.

Com a ocorrência de epidemias explosivas de dengue em grandes centros urbanos, com rápida propagação viral e potencial gravidade dos casos de FHD, a doença se caracteriza como reemergente, de alto impacto econômico e importância na saúde pública mundial (SUAYA *et al.*, 2007).

1.3 Agente etiológico

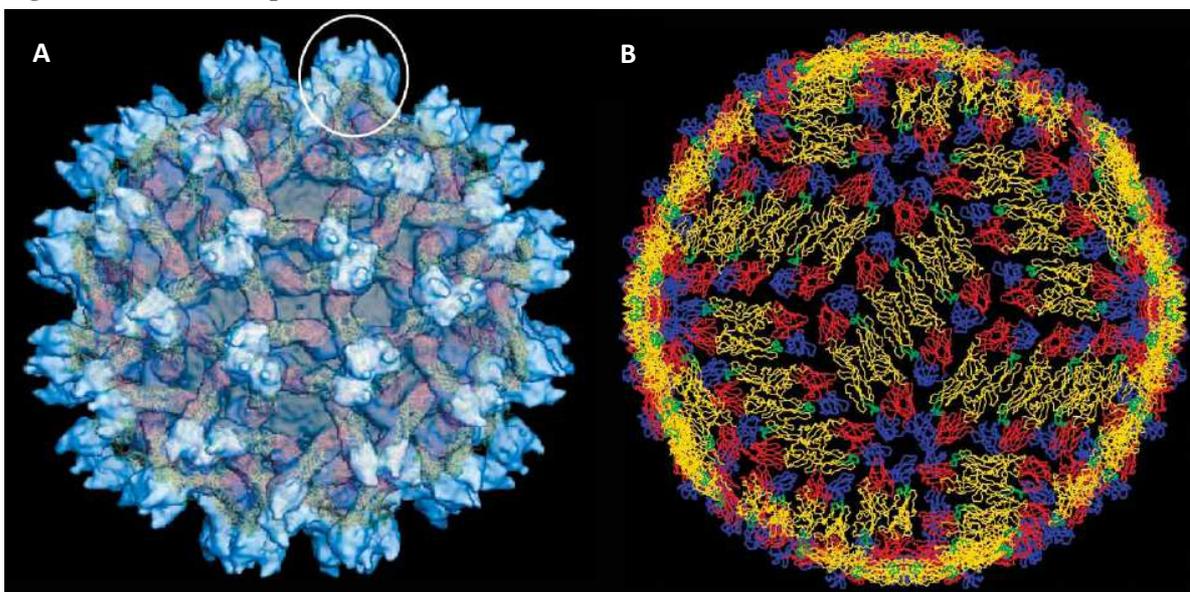
A dengue é transmitida por um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivírus*. Existem quatro sorotipos classificados de acordo com suas propriedades imunológicas - DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. A infecção com um sorotipo confere imunidade permanente contra esse sorotipo, mas apenas uma proteção temporária contra a infecção por outros sorotipos, e todos os sorotipos estão envolvidos com o acometimento da enfermidade e com o surgimento de formas graves (SHUIPING *et al.*, 2007).

O DENV, bem como outros vírus de RNA, apresentam uma alta taxa de mutação associada à ausência de atividade revisora da RNA polimerase viral durante a replicação (HOLLAND *et al.*, 1982). Devido à alta taxa de mutação gerada, os vírus de RNA não constituem um único genótipo, mas um grupo de genomas relacionados denominados *quasispecies* (HOLLAND *et al.*, 1992). Devido a esta alta taxa de mutação, é gerada uma grande variabilidade genética. Em acréscimo a isso, a recombinação gênica também tem intensificado a diversidade genética do DENV (HOLMES *et al.*, 1999; HOLMES; TWIDDY, 2003; WOROBEY *et al.*, 1999).

1.3.1 Estrutura e genoma viral

Os vírions maduros são esféricos, medem entre 40 e 60 nanômetros (nm) de diâmetro e apresentam simetria icosaédrica (LINDENBACH; RICE, 2003; MURPHY, 1980). Apresentam um envelope lipídico derivado da célula hospedeira e no qual estão inseridos dois tipos de proteínas, a proteína Envelope (ENV) e a proteína de membrana (M), ou sua precursora proteína pré-membrana (prM) (figura 9).

Figura 8 - Estrutura superficial de DENV.

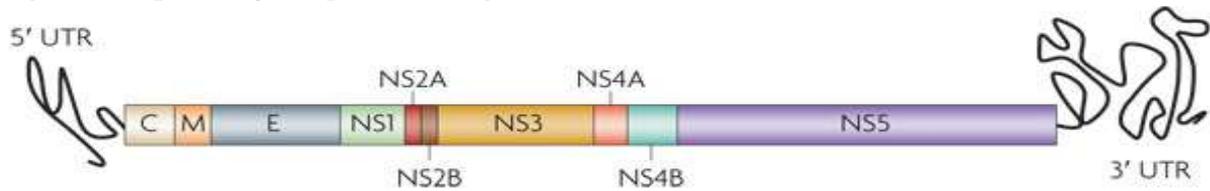


Fonte: Adaptado de Mackenzie, Gubler e Petersen (2004).

Nota: Em (A) Partícula imatura. Possui 60 espículas (círculo) proeminentes em sua superfície, tornando-a menos lisa que a partícula madura. (B) Estrutura do vírus maduro. A membrana é lisa e é completamente recoberta por uma estrutura protéica. Os diferentes domínios da proteína ENV são representados por diferentes cores – vermelho: domínio I, amarelo: domínio II e azul: domínio III.

DENV possui um nucleocapsídeo que consiste de várias cópias da proteína de capsídeo e uma molécula de ácido ribonucléico (*ribonucleic acid*, RNA) de aproximadamente 11 kb, de fita simples e polaridade positiva (*+single strain RNA*, +ssRNA), sendo desta forma infeccioso (RICE, 1996). O +ssRNA genômico é flanqueado por uma estrutura 5' cap tipo I (m7GpppAmp) e uma extremidade 3' terminal não-poliadenilada (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH e RICE, 2001; RICE *et al.*, 1985), conforme pode ser visto na figura 10. Tanto a extremidade 5' quanto a 3' possuem uma região não-codificante (regiões UTR, *untranslated region*) de aproximadamente 120 nucleotídeos (nt) e 500 nt, respectivamente, que parecem desempenhar importante papel na iniciação e modulação da tradução e replicação do genoma viral (ALVAREZ *et al.*, 2006; CHIU *et al.*, 2005).

Figura 9 - Representação esquemática do genoma de DENV.



Fonte: Guzman *et al.* (2010).

Nota: DENV é formado por um genoma de RNA de polaridade positiva, fita simples, infeccioso, destacando as regiões 5' e 3' UTR, a região codificante para as proteínas estruturais – CAP, M e ENV, e a região codificante para as sete proteínas não-estruturais – NS, *non-structural*.

1.3.2 Proteínas virais

O RNA genômico possui uma única janela aberta de leitura (*open reading frame*, ORF), codificando uma longa poliproteína precursora que, após sucessivas clivagens por proteases do hospedeiro vertebrado e do próprio vírus, resulta na formação de três proteínas estruturais, CAP, prM/M e ENV, e de sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (CHAMBERS *et al.*, 1990; PERERA; KUHN, 2008).

A proteína CAP é uma proteína básica, o que confere capacidade para uma forte ligação ao RNA (CHAMBERS *et al.*, 1990). Ela possui aproximadamente 11 kDa, e é responsável pela estrutura da partícula viral.

A proteína prM (26 kDa) é a glicoproteína precursora da proteína de Membrana, M (8 kDa). A principal função de prM é evitar a exposição da forma fusogênica da proteína ENV durante a passagem pela via secretória celular (CHAMBERS *et al.*, 1990).

A proteína ENV é a principal proteína do envelope viral, com aproximadamente 53 kDa. É uma proteína N-glicosilada, com 12 cisteínas conservadas que formam pontes dissulfeto. A proteína é dividida em 3 domínios. Dentre estes, o domínio II constitui o domínio fusogênico, e o domínio III é responsável pela ligação ao receptor, sendo o principal alvo de anticorpos neutralizantes. A proteína ENV detém importantes funções biológicas do vírus, como ação de hemaglutinina viral, capacidade fusogênica com membranas da célula hospedeira, indução de resposta imune protetora e interação com receptores na superfície das células-alvo (MODIS *et al.*, 2004).

Evidências indicam que a proteína ENV desempenha um papel na patogenicidade de diversos flavivírus, não apenas pela definição do tropismo celular, mas também pela entrada do vírus na célula-alvo (GOLLINS; PORTERFIELD, 1986; MODIS *et al.*, 2004; REY *et al.*,

1995). É uma proteína de fusão classe II e compartilha aproximadamente 40% de identidade aminoacídica entre os *Flavivírus* (PERERA *et al.*, 2008).

As proteínas não-estruturais (NS) estão envolvidas na modulação da resposta do hospedeiro e na replicação do RNA viral (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997).

A proteína NS1, com aproximadamente 45 kDa, é uma glicoproteína hidrofílica com importante, embora desconhecido, papel na replicação viral. Reconhecidamente está envolvida na patogênese e na ativação do sistema complemento (JACOBS *et al.*, 2000). A proteína NS1 é encontrada tanto em sua forma ligada à célula quanto secretada em forma de hexâmeros, em altos níveis no início da infecção (FLAMAND *et al.*, 1999; WINKLER *et al.*, 1988; WINKLER *et al.*, 1989), o que pode explicar a produção de anticorpos contra esta proteína, detectada em soro de pacientes antes mesmo do RNA viral ser detectado por RT-PCR (ALCON *et al.*, 2002) e torná-la um importante marcador da fase aguda da infecção.

A proteína NS2a, ~22 kDa, é uma proteína hidrofóbica co-localizada com o complexo de replicação (MACKENZIE *et al.*, 1998), interagindo com NS3 e NS5. Existem relatos que mostram seu papel na interferência na via de sinalização do interferon (LIU *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005). NS2b, por sua vez, possui ~14 kDa, e é uma proteína associada a membrana, que interage com NS3, sendo essencial para o desempenho da sua atividade de protease (LIN *et al.*, 1993; FALGOUT *et al.*, 1991).

NS3 tem função essencial para a replicação e processamento da poliproteína viral; sua região N-terminal possui atividade serino-protease; na região C-terminal estão concentradas as atividades helicase e NTPase (CHEN *et al.*, 1997).

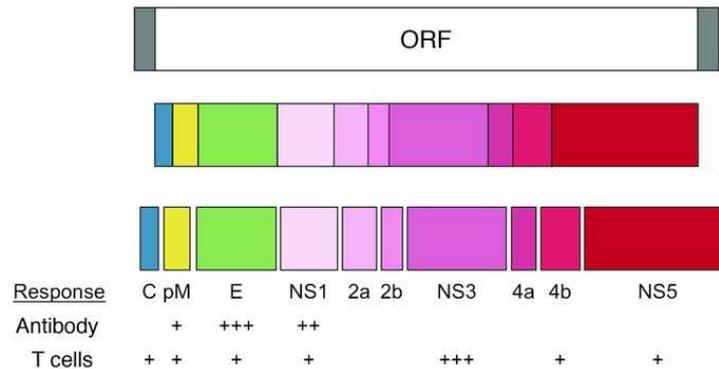
Não se têm evidências diretas sobre a função das proteínas NS4a (~16 kDa) e NS4b (~27 kDa). No entanto, estudos recentes sugerem que NS4a está ancorada à membrana do retículo e interage com as proteínas NS1, NS3 e NS5 (WESTAWAY *et al.*, 2003), estando portanto co-localizada com o complexo de replicação. NS4b parece ter atividade de bloqueio da sinalização de interferon tipo I (LINDENBACH; RICE, 2003), estando associada a membrana e colocalizada com NS3 e RNA fita-dupla.

NS5, a RNA polimerase viral, é uma proteína com sequência altamente conservada. É a maior proteína viral, com aproximadamente 103 kDa, com atividade de RNA polimerase dependente de RNA e atividade metil-transferase. NS5 forma ainda complexo com NS3, estimulando suas atividades durante a replicação do genoma (KAMER; ARGOS, 1984; CHAMBERS *et al.*, 1990; KOONIN, 1993; LINDENBACH; RICE, 2003).

A figura 11 representa esquematicamente como cada proteína viral contribui para a resposta imunológica humoral e celular do indivíduo infectado. Ressalta-se a importância das

proteínas ENV e NS1 na resposta imune humoral em infecções por DENV. Ambas são consideradas de extrema relevância por contribuírem muito fortemente para o processo de resposta imunológica desencadeado pelo vírus (ROTHMAN, 2004).

Figura 10 - Representação esquemática da contribuição de cada proteína viral para a resposta imunológica do hospedeiro humano à infecção por DENV.



Fonte: Rothman (2004).

Nota: A figura ressalta a importância das proteínas ENV e NS1 na geração de anticorpos (resposta humoral) contra o vírus DENV.

1.4 Prevenção e tratamento

Não há nenhuma droga antiviral específica disponível para pacientes infectados com DENV, e o tratamento é basicamente de suporte com reposição de fluídos e eletrólitos, repouso e uso de analgésicos e antitérmicos. O acetaminofeno (paracetamol) é a droga de escolha para o tratamento da febre e da dor. Aspirina e antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) são contra-indicados, pois eles estão associados com o aumento do risco de manifestações hemorrágicas. Pacientes com hipotensão ou coagulação intravascular disseminada (CID) devem ser admitidos à unidade de terapia intensiva (HERRLING, 2006; LUPI, 2011). Enquanto drogas terapêuticas específicas não estão disponíveis, monitoramento dos casos e cuidados intensivos providos por um diagnóstico precoce podem reduzir a taxa de mortalidade dos casos graves para menos que 1%. No entanto, testes de laboratório rápidos e confiáveis não estão ainda amplamente disponíveis, em especial para os primeiros quatro a cinco dias da infecção, limitando a capacidade de identificar pacientes em estágios iniciais (HALSTEAD, 2007).

Há consenso de que a utilização de uma vacina eficaz é a melhor opção para controlar esta doença (DOUGLAS *et al.*, 2009). Uma grande variedade de vacinas contra DENV está sendo elaborada e testada, porém há algumas limitações no

desenvolvimento de uma vacina eficiente, como ausência de um modelo animal adequado capaz de reproduzir as formas graves da doença e a necessidade de uma vacina que confira imunidade em longo prazo (MAHONEY *et al.*, 2011). Principalmente, uma vacina contra dengue deve ser eficaz contra os quatro sorotipos virais, ou seja, tetravalente. A busca pela indução de uma resposta imunológica robusta para todos os quatro sorotipos ao mesmo tempo se deve à tentativa de evitar a possível exacerbação do risco de desenvolver as formas graves da doença, como FHD, decorrente de uma resposta imune incompleta ou modificada (GUY, 2009). A teoria da geração de uma resposta imune adversa diante de uma reinfeção heterotípica em indivíduos não protegidos contra os quatro sorotipos, devido ao aumento da replicação viral através da presença de anticorpos não-neutralizantes heterotípicos advindos de uma infecção prévia, é conhecida como *antibody-dependent enhancement* (ADE), e tem sido largamente estudada e várias vezes associada ao desenvolvimento de formas graves da doença (GUZMÁN, 1998).

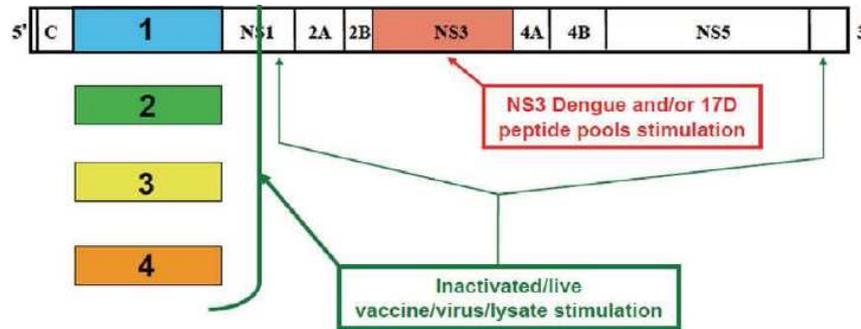
As vacinas em desenvolvimento utilizam principalmente vírus atenuados pela passagem seriada em culturas de células (EDELMAN *et al.*, 2003; KITCHENER *et al.*, 2006), pela introdução de deleções na extremidade 3' não-codificante (WHITEHEAD *et al.*, 2003) ou pela substituição dos genes correspondentes às proteínas prM e ENV da cepa vacinal de febre amarela 17D pelos respectivos genes de cada um sorotipos de dengue (GUIRAKHOO *et al.*, 2001).

Outras abordagens, como vacinas que utilizam vírus inativados (PUTNAK *et al.*, 2005), subunidades dos vírus (GUZMÁN *et al.*, 2003; PUTNAK *et al.*, 2005), vacinas de ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*, DNA) (RAVIPRAKASH *et al.*, 2003) e vacinas que utilizam vetores de expressão não-replicativos (MEN *et al.*, 2000), também estão sendo estudadas.

Hoje, as vacinas em desenvolvimento clínico incluem quatro vacinas de vírus vivos atenuados e uma vacina de subunidade em desenvolvimento pela empresa Havaii Biotech (em julho de 2010, a Merck Vacinas e Co. adquiriu os direitos para a vacina da Havaii Biotech e manifestou a intenção de continuar o desenvolvimento do candidato vacinal). Uma das vacinas de vírus vivos atenuados (GlaxoSmithKline) é uma vacina tradicional preparada pela passagem de células. As outras três são construções genéticas e envolvem a utilização de quimeras e deleções genéticas (MAHONEY *et al.*, 2011). No entanto, a estratégia em desenvolvimento mais avançada envolve os ensaios clínicos de fase III do candidato vacinal tetravalente pela iniciativa Sanofi Pasteur. Essa proposta é baseada na vacina para febre

amarela 17D, onde os genes prM e ENV de febre amarela são substituídos pelos genes correspondentes de cada sorotipo de DENV (figura 12).

Figura 11 - Estrutura da vacina quimérica contra a dengue da iniciativa Sanofi Pasteur.



Fonte: Guy (2009).

Nota: Representação esquemática das cepas individuais da vacina tetravalente contra DENV. Os genes da capa protéica (prM e ENV) do vetor vacinal da febre amarela (FA17D) são substituídos pelos genes correspondentes de cada sorotipo do vírus DENV, gerando quatro vacinas quiméricas contra a dengue, apresentando um fenótipo de superfície de dengue, dentro de um mecanismo de replicação de FA17D.

Desta forma, quatro vacinas quiméricas foram geradas, cada uma das quais apresentando um fenótipo de superfície para cada sorotipo de DENV, com uma maquinaria de replicação de FA17D (genes NS). Essas vacinas crescem bem em cultura de células Vero, mostraram-se seguras e imunogênicas em ensaios pré-clínicos e avaliação clínica, e são capazes de desencadear a auto-limitação da infecção e eficiente ativação de células dendríticas *in vitro* (GUY, 2009). A vacina da Sanofi Pasteur entrou em fase ampliada de testes (Fase 2-B) em 2009 na Tailândia e iniciou a fase de testes clínicos (fase 3) em novembro de 2010 na Austrália. Esse avanço na avaliação clínica da vacina da Sanofi Pasteur indica que a vacina é segura e eficaz, e é possível que o licenciamento possa ocorrer até 2014.

1.5 Diagnóstico laboratorial

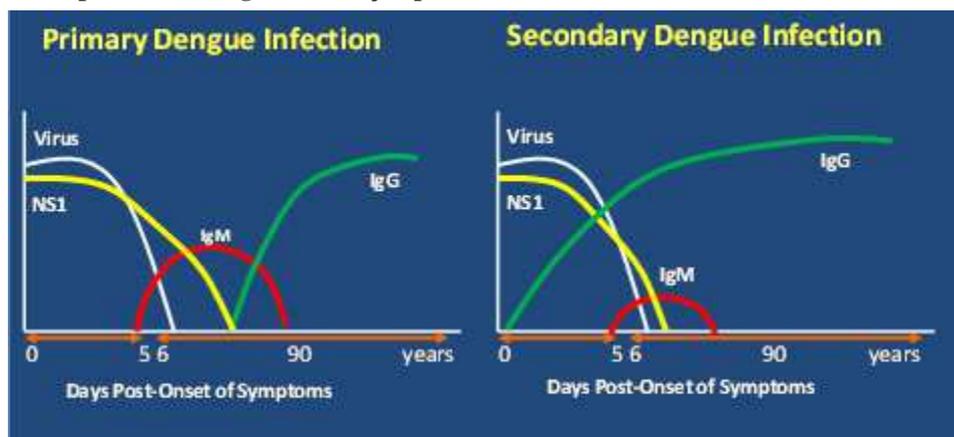
O diagnóstico preciso e precoce da dengue é de fundamental importância para o manejo clínico dos pacientes, assim como para a orientação de ações epidemiológicas direcionadas para o controle da doença. Por se tratar de uma doença de sintomas genéricos, o diagnóstico de dengue com base apenas na síndrome clínica não é confiável, e deve ser confirmado por testes laboratoriais, uma vez que mais da metade dos indivíduos infectados são assintomáticos ou tem febre indiferenciada (SHU; HUANG, 2004).

Considerando que a dengue tem um amplo espectro clínico, as principais doenças que fazem diagnóstico diferencial são: influenza, enterovirose, doenças exantemáticas (sarampo, rubéola, parvovirose, eritema infeccioso, mononucleose infecciosa, exantema súbito, citomegalovirose e outras), hepatites virais, abscesso hepático, abdome agudo, hantavirose, arboviroses (Febre Amarela, Mayaro, Oropouche e outras), escarlatina, pneumonia, sepse, infecção urinária, meningococemia, leptospirose, malária, salmonelose, riquetsioses, doença de *Henoch-Schonlein*, doença de *Kawasaki*, púrpura auto-imune, farmacodermias e alergias cutâneas. Outros agravos podem ser considerados conforme a situação epidemiológica da região (BRASIL, 2007).

Um diagnóstico rápido, preciso e de baixo custo é de extrema importância, principalmente em regiões endêmicas, para a vigilância epidemiológica, para estudos patológicos, clínicos e imunológicos da doença e para manejos clínicos apropriados.

Além disso, existe uma premente necessidade de detecção rápida e diferenciação da infecção por DENV na fase aguda da doença a fim de prover tratamento clínico em tempo hábil, monitoramento de casos, investigação etiológica e controle da doença. É importante considerar o período da doença em que o paciente se encontra (figura 13) para com isso decidir qual o tipo mais apropriado de teste (detecção de material genético viral, detecção de IgM, detecção de IgG, isolamento viral, detecção de antígeno NS1, entre outros) a ser utilizado e fazer uma correta interpretação dos resultados obtidos (KAO *et al.*, 2005).

Figura 12. Resposta imunológica à infecção por DENV.



Fonte: Centers for Disease Control (2010).

Nota: A resposta imune adquirida após uma infecção de dengue consiste na produção de anticorpos IgM e IgG. A resposta imune varia dependendo se o indivíduo passa por uma infecção primária ou secundária. A detecção de antígeno NS1 se dá nos primeiros dias da infecção, durante a fase aguda da doença.

Os métodos indicados para diagnóstico laboratorial são (BRASIL, 2007):

a) Diagnóstico sorológico - método ELISA, utilizado para detecção de anticorpos antidengue, e deve ser solicitada a partir do sexto dia do início dos sintomas.

b) Detecção virológico – identificação do patógeno e monitoramento do sorotipo viral circulante.

c) Diagnóstico laboratorial de óbitos - exames histopatológico e imunohistoquímica.

Várias técnicas vêm sendo utilizadas, como isolamento viral, inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, RT-PCR, imunohistoquímica e ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) (SHU; HUANG, 2004).

A viremia de dengue é curta, geralmente é observada de dois a três dias antes do aparecimento da febre até quatro a cinco dias depois. Assim, a detecção viral pode ser realizada a partir de amostras recolhidas nos primeiros cinco dias de sintomas da doença (GUZMÁN; KOURI, 2004).

Alguns métodos comumente utilizados para o isolamento viral são: inoculação em culturas de células de mosquito, inoculação em culturas de células de mamíferos, inoculação intratorácica de mosquitos adultos e inoculação intracerebral de camundongos recém-nascidos. Mais recentemente, métodos moleculares como a RT-PCR e hibridização de ácidos nucleicos (LUPI, 2011) vem somar esforços na identificação do patógeno, juntamente com a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), que permite a detecção e determinação da carga viral em amostras de soro coletadas na fase aguda da doença (SHU; HUANG, 2004).

Quanto a detecção de anticorpos circulantes, a resposta humoral é apresentada em dois padrões distintos, que dependem da condição imunológica do paciente infectado. Na infecção primária, na qual o indivíduo nunca foi exposto ao DENV, geralmente de três a cinco dias após o início da febre os pacientes apresentam níveis detectáveis de imunoglobulina M - IgM antidengue que persistem de 30 a 60 dias. A imunoglobulina G - IgG se eleva depois de nove a dez dias de infecção e permanece detectável por toda a vida do indivíduo (GUBLER, 1996).

Em contrapartida, durante a infecção secundária, que ocorre em indivíduos previamente infectados por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV, os níveis de IgM se elevam mais tardiamente e alcançam valores mais baixos do que numa infecção primária, enquanto os níveis de anticorpos tipo IgG aumentam um a dois dias após o início da febre e alcançam níveis mais altos do que em infecções primárias (GUBLER, 1999). Portanto, é importante recolher amostras de soro tanto de fase aguda como convalescente, para determinação de infecções recentes, assim como diferenciação de infecções primárias e secundárias.

Para fins diagnósticos, dentre as proteínas estruturais e NS do vírus, destaca-se a aplicabilidade das proteínas ENV e NS1 (COSTA *et al.*, 2006; DUSSART *et al.*, 2006; KOCHER *et al.*, 2000). Ambas são consideradas de extrema relevância por contribuírem muito fortemente para a resposta imunológica desencadeada pelo vírus, sendo ENV o principal alvo de anticorpos neutralizantes produzidos pelo hospedeiro (BURKE e MONATH, 2001) e a proteína NS1, por estar em altas concentrações, na sua forma solúvel, no soro de pacientes durante a fase inicial de infecção (GLUBER, 1998; LINDENBACH; RICE, 2001).

Quanto à detecção de antígenos virais, estudos recentes demonstraram que altas concentrações do antígeno NS1 são detectadas em soros de pacientes em fase aguda da doença (tanto primária como secundária), até nove dias depois do início dos sintomas (ALCON *et al.*, 2001; KORAKA *et al.*, 2003; YOUNG *et al.*, 2000).

Muitos testes sorológicos têm sido utilizados para o diagnóstico da dengue, que detectam qualquer um dos quatro sorotipos, mas não distinguem de forma confiável entre os quatro. Testes sorológicos rápidos e precisos são prioridades de saúde pública provocadas pelo aumento dramático no número de infecções por DENV e pela situação alarmante do sistema de saúde, em situações de epidemia. Os principais testes aplicados são ensaio imunoenzimático de captura para IgM (MAC-ELISA), ELISA indireto para detecção de IgG, ensaios de fixação de complemento (FC), inibição da hemaglutinação (IH) e testes de neutralização. A alta reatividade cruzada, observada com estes testes, é considerada uma limitação dessas técnicas (LUPI, 2011).

1.5.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA

O teste sorológico por ELISA é o principal método de diagnóstico utilizado, sendo considerado o método padrão preconizado pela Organização Mundial da Saúde e adotado pelo MS no Brasil (BRASIL, 2005). O imunoensaio recomendado é o ELISA de captura de IgM.

Essa abordagem em geral apresenta alta sensibilidade e especificidade, no entanto, as dificuldades envolvendo a técnica, como longo tempo na preparação das reações, longas incubações, grande dispêndio de antígeno/anticorpo, são fatores limitantes que destacam a necessidade da incorporação de uma nova tecnologia para o diagnóstico da doença (WONG *et al.*, 2004).

Testes ELISA também tem sido utilizados para determinar o tipo de infecção, primária ou secundária, através da relação IgM/IgG (KUNO *et al.*, 1991; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1999; SHU; HUANG, 2004).

No Brasil, o kit da PanBio Diagnostics (Austrália) é utilizado nos laboratórios públicos de diagnóstico, e o custo das reações acaba sendo elevado devido às taxas de importação. Além disso, a hiperendemicidade e a grande quantidade de casos reportados, seja de DC ou FHD/SCD, destacam a urgência do desenvolvimento de um kit de diagnóstico nacional, sensível e específico (HUNSPERGER *et al.*, 2009).

1.5.2 Microarranjos líquidos

Tecnologias baseadas em microarranjos líquidos, como a plataforma Luminex, oferecem uma nova abordagem (para detecção de antígeno/anticorpo) de alto rendimento que está sendo utilizada em uma variedade de aplicações (CHEN *et al.*, 2000; DUNBAR *et al.*, 2003; FULTON *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1998; WALLACE *et al.*, 2003). Alguns dos benefícios da tecnologia de microarranjos líquidos incluem a aquisição rápida de dados, excelente sensibilidade e especificidade, e capacidade de análise de múltiplos ensaios simultâneos. Em comparação com microarranjos sólidos, as matrizes de suspensão tem a vantagem da facilidade de uso, baixo custo, a superioridade estatística, cinética mais rápida de hibridização e maior flexibilidade na elaboração da matriz (DUMBAR, 2005).

O sistema Luminex xMAP incorpora microesferas de poliestireno de 5,6 micrômetros (μm), internamente tingidas com dois fluorocromos espectralmente distintos. Usando quantidades precisas de cada um dos fluorocromos, é criada uma matriz composta de 100 conjuntos de microesferas com diferentes endereços espectrais específicos. Cada microesfera pode possuir um diferente reagente em sua superfície. Como as microesferas podem ser distinguidas por seu endereço espectral, podem ser combinadas no mesmo ensaio, permitindo até 100 diferentes análises simultâneas em uma única reação. Um terceiro fluoróforo acoplado a uma molécula repórter, como um anticorpo, quantifica a interação biomolecular que ocorreu na micros superfície da esfera (DUMBAR, 2005).

Dessa forma, as microesferas são interrogadas individualmente em um sistema fluídico de fluxo rápido, que é atravessado por dois *lasers* separados no analisador Luminex. O *laser* vermelho de 635 nm excita os dois fluorocromos contidos no interior da esfera, e o *laser* de 532 nm excita o fluorocromo repórter (ficoeritrina, Alexa 532, ou Cy3) ligado à superfície de microesferas.

A alta velocidade de processamento do sinal digital classifica as microesferas com base em seus endereços espectrais e quantifica a reação na superfície, numa velocidade de milhares de microesferas por segundo (DUMBAR, 2005).

Portanto, a tecnologia de microarranjos líquidos destaca-se como uma nova ferramenta para diagnóstico, com largas possibilidades de ser aplicada na detecção da infecção por flavivírus, como visto por Wong *et al.* (2004). Trata-se de uma abordagem dinâmica, rápida, capaz de aumentar a sensibilidade/especificidade dos testes utilizando pequenos volumes de amostra e possibilitando o diagnóstico em larga escala, essencial para situações epidêmicas. A possibilidade de aplicar uma tecnologia que diagnostique em um curto espaço de tempo um grande número de pacientes para 100 diferentes tipos de doenças por reação deverá ser muito bem recebida pelo sistema de saúde, com larga possibilidade de redução de custos e tempo. Este tipo de tecnologia é de fundamental importância para o desenvolvimento tecnológico nacional, formação de recursos humanos e geração de kits de diagnóstico de primeira geração com alto valor agregado.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que a dengue é atualmente a principal arbovirose mundial, atingindo milhões de pessoas em todo mundo anualmente, e que até então não há nenhuma vacina nem droga antiviral específica comercialmente disponível, cada vez mais estudos são direcionados para compreender a dinâmica da infecção viral e a resposta imune do hospedeiro. Como os sintomas iniciais da dengue podem ser confundidos com uma série de outras infecções comuns, o diagnóstico diferencial é essencial, objetivando o adequado manejo dos pacientes e monitoramento de casos. Para tanto, é fundamental um teste diagnóstico rápido, inequívoco e de baixo custo.

Vários testes de diagnóstico existem, sendo os testes de ELISA os mais amplamente utilizados. Os antígenos são inativados utilizando partículas virais produzidas em cultura de células ou extrato bruto, tais como cérebro de camundongo infectadas por vírus, o que limita a técnica por fatores diversos, tais como a variabilidade dos lotes, questionamentos bioéticos e manipulações em animais de laboratório e, finalmente, os riscos de manipulação de material patogênico. Uma boa alternativa é a utilização de antígenos recombinantes que podem substituir os utilizados atualmente, com a vantagem de potencial maior reprodutibilidade, menor custo e maior segurança.

O Brasil apresenta uma forte dependência tecnológica dos insumos e produtos no setor de kits de diagnóstico, adquiridos pelo MS através de importação a altos custos para a realidade nacional. O desenvolvimento de kits comerciais incorporando novas tecnologias como a produção de antígenos quiméricos e plataformas de microarranjos líquidos deverá impulsionar o setor nacional de desenvolvimento de kits de diagnóstico, diminuindo a dependência tecnológica e colocando o Brasil em condições de disputa no mercado de imunodiagnóstico internacional. Finalmente, o desenvolvimento deste tipo de tecnologia no território nacional deverá ainda contribuir com a formação de recursos humanos e geração de novos empregos qualificados neste setor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um kit de diagnóstico para a detecção de infecções humanas pelos quatro sorotipos de DENV.

3.2 Objetivos específicos

a) Selecionar em bancos de dados públicos sequências das proteínas ENV e NS1 dos quatro sorotipos de DENV circulantes na região Sul-americana;

b) Otimizar as sequências de DNA para a expressão em sistemas bacterianos;

c) Expressar, purificar e caracterizar as proteínas virais recombinantes;

d) Produzir e caracterizar um anti-soro contra as proteínas recombinantes;

e) Desenvolver ensaios imunológicos, utilizando os antígenos e anticorpos produzidos, por diferentes técnicas.

f) Desenvolver ensaios de microarranjos líquidos para diagnóstico de dengue e determinar a especificidade, sensibilidade e avaliar a potencial aplicação na identificação de infecções por DENV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de sequências e construção dos antígenos quiméricos

Sequências de aminoácidos codificantes das proteínas ENV e NS1 dos quatro sorotipos do DENV, isoladas exclusivamente no continente sul-americano, foram obtidas a partir da interface de pesquisa *Virus Variation Resources* (VVR), gerida pelo *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (RESCH *et al.*, 2009). As regiões genômicas obtidas foram alinhadas, separadas por sorotipo viral, utilizando-se o algoritmo *MultAlin* (CORPET, 1988), o que permitiu a geração de sequências consenso sorotipo-específicas tanto para a proteína ENV quanto para NS1. Tais sequências foram submetidas à otimização gênica para posterior síntese comercial.

4.2 Otimização e síntese das sequências de DNA para expressão em células procarióticas

As construções gênicas obtidas foram otimizadas para a expressão em *Escherichia coli* (*E. coli*) através do programa LETO 1.0 (Entelechon). Com o algoritmo genético suportado por esse programa, as sequências de DNA selecionadas previamente foram analisadas em diversos parâmetros simultaneamente. A otimização concomitante de cada uma das características de interesse, como *codon usage*; estrutura secundária do RNA mensageiro (RNAm); motivos repetitivos de DNA, distribuição do conteúdo de guanina (G) e citosina (C); sítios crípticos de *splicing*, sequências longas repetitivas de DNA, presença/ausência de sítios específicos de restrição, objetivou permitir um aumento significativo nos níveis de expressão das proteínas virais em células procarióticas, além de permitir as estratégias de clonagem previamente estabelecidas.

As sequências otimizadas foram fusionadas a dois sítios múltiplos de clonagem: 5' (*Hind* III, *Xho* I, *Nde* I e *Spe* I) e 3' (*Sap* I, *Not* I e *Nco* I), que permitem a clonagem do gene de interesse, em diferentes vetores de expressão, através de estratégias de subclonagem. As sequências dos genes otimizados, flanqueadas pelos sítios múltiplos de clonagem, foram enviadas para a síntese comercial (GenScript, disponível em: <www.genscript.com>, acesso em: 20 fev 2010), e em seguida subclonadas no vetor de expressão pRSETA (Invitrogen), para a obtenção de antígenos fusionados à cauda de histidina.

4.3 Construção dos vetores de expressão

4.3.1 Preparação de células competentes

Bactérias *E. coli*, linhagens DH10B (utilizadas para clonagem gênica) e BL21 *Star* (utilizadas para expressão protéica), ambas obtidas através da companhia Invitrogen, foram tornadas quimicamente competentes para a recepção de DNA plasmidial através de tratamento a base de cátions bivalentes (cálcio, Ca^{++} e magnésio, Mg^{++}). Uma colônia de cada linhagem celular foi inoculada em cinco mililitros (ml) de meio Luria Bertani (LB) (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl), e submetida a crescimento a 37 graus celsius ($^{\circ}\text{C}$), 225 rotações por minutos (rpm), durante 18 horas (h). Após esse período, dois e meio ml dessa cultura foram inoculados em 250 ml de meio LB, e submetidos a agitação de 225 rpm, 37 $^{\circ}\text{C}$, até a cultura atingir uma densidade óptica (DO) entre 0,5 e 0,6 (aproximadamente 2×10^8 células/ml) no comprimento de onda de 600 nm.

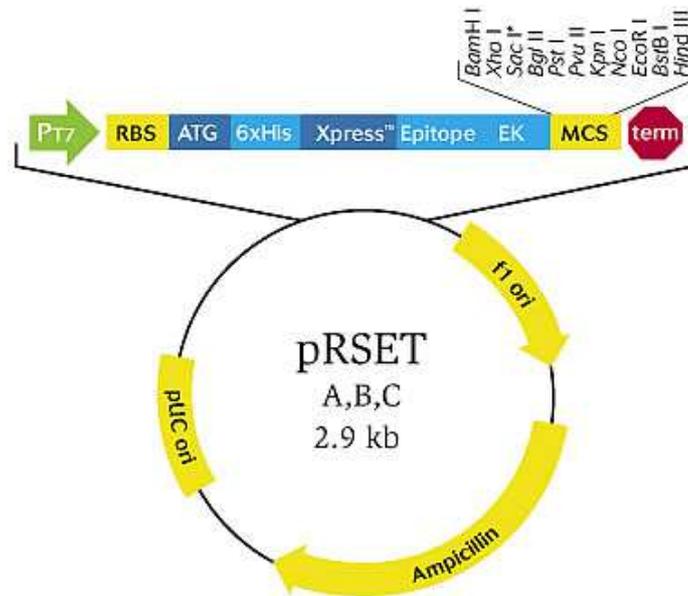
As células foram resfriadas em gelo durante uma hora, e transferidas para tubos de polipropileno gelados para serem centrifugadas a 4 $^{\circ}\text{C}$, 5500 rpm, por cinco minutos. As células foram mantidas a temperatura de aproximadamente 4 $^{\circ}\text{C}$ em todos os passos subsequentes. O sobrenadante foi removido, e as células foram totalmente ressuspensas em 30 ml de solução 100 milimolar (mM) de cloreto de cálcio (CaCl_2) gelada. Após 30 minutos de incubação no gelo e nova centrifugação a 4 $^{\circ}\text{C}$, 5000 rpm por sete minutos, as células foram ressuspensas em cinco ml de solução 100mM CaCl_2 gelada, acrescida de 15% glicerol, alíquotadas e armazenadas a -80 $^{\circ}\text{C}$. A eficiência de transformação das células foi verificada através da contagem do número de transformantes obtidos com 1 μg de plasmídeo de DNA *supercoiled* pUC19 (Sigma-Aldrich).

4.3.2 Preparação do vetor de expressão pRSETA (Invitrogen)

O vetor selecionado para expressão dos genes sintéticos foi o pRSETA (Invitrogen). Como mostrado na figura 14, o vetor pRSETA é um vetor PUC-derivado, desenhado para obter alto rendimento de expressão e purificação de proteínas produzidas em *E. coli*, o que acontece graças à ação do promotor T7. Os insertos de DNA são posicionados logo após, e em fase, com uma sequência que codifica um peptídeo de fusão N-terminal, que, entre outros elementos, possui uma região com seis histidinas (His) que, na proteína traduzida, funcionará

como domínio de ligação ao metal níquel, permitindo simples purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade.

Figura 13 - Representação esquemática do vetor pRSETA.



Fonte: Invitrogen, 2010.

Nota: O vetor possui um total de 2897 nucleotídeos, contendo um gene que confere resistência a ampicilina (AMP, marcador de seleção). O vetor pRSETA possui o forte promotor T7, o sítio de ligação ao ribossomo (*Ribosome Binding Site* – RBS) e o códon de iniciação da expressão adenina-timina-guanina (ATG). As seis His da porção N-terminal permitem a purificação da proteína de fusão em cromatografia de afinidade com resinas com íons metálicos, como o níquel, além de favorecer a detecção da proteína com o uso de anticorpos anti-His.

A expressão do gene de interesse é controlada pela ação do promotor T7, reconhecido especificamente pela T7 RNA polimerase, através da ação do indutor de expressão isopropil β-D-tiogalactosídeo (IPTG).

Uma alíquota de 50 µl de células competentes DH10B, com eficiência de $2,5 \times 10^6$ colônias por µg de DNA foi transformada por choque térmico, com 25 µl de tampão de transformação [5mM cloreto de magnésio (MgCl₂), 5mM Tris-ácido clorídrico (tris-HCl) pH 7.4] e 1 µg do vetor pRSETA. As bactérias foram semeadas em placa de meio LB sólido suplementado com ampicilina (LB/AMP) na concentração de 50 µg/µl. Após 16 h de incubação, um colônia foi selecionada para inóculo em 50 ml de meio LB/AMP, e submetida a crescimento a 37 °C, 225 rpm, durante 12 h. Esse volume foi inoculado em 500 ml de meio LB/AMP e submetido a nova expansão celular a 37 °C, 225 rpm, por mais 18 h. Após centrifugação (8000 rpm, 20 minutos), o sobrenadante foi desprezado e com o sedimento bacteriano foi realizada a extração de DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Midiprep (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a extração e quantificação através de nanofotômetro (Implen), o plasmídeo purificado obtido foi submetido à clivagem com a enzima *Nhe* I (*New England Biolabs*), em uma reação com volume final de 50 µl contendo: 1x tampão de clivagem, 5 µg do vetor e 5 unidades (U) da enzima. A clivagem foi realizada a 37 °C, durante 6 h, e os produtos da clivagem foram visualizados em gel 1% agarose corado com brometo de etídio. Em seguida, o DNA clivado enzimaticamente foi precipitado com a adição de 12 µl de 5 M cloreto de sódio (NaCl) e 500 µl de 100% etanol, seguido de incubação no gelo seco durante 30 minutos e centrifugação a 13200 rpm por 10 minutos. O DNA precipitado foi desidratado por três minutos no vácuo e ressuspensionado em 40 µl de água Milli-Q. Foram adicionados 1x tampão de clivagem e 5 U da enzima *Nco* I (*New England Biolabs*), seguido por incubação a 37 °C por 6 h. Para confirmar a clivagem do vetor, os fragmentos obtidos foram fracionados junto ao DNA intacto (não linearizado) para comparação relativa de peso molecular em gel 1% agarose, corado com brometo de etídio. O vetor linearizado foi, em seguida, purificado utilizando o kit comercial QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante, e quantificado por espectrofotometria.

4.3.3 Preparação dos vetores contendo os genes otimizados

As sequências gênicas otimizadas das proteínas ENV e NS1 foram sintetizadas comercialmente e enviadas ao nosso laboratório em plasmídeos *pUC57-Simple* (GenScript). Esses plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias DH10B quimicamente competentes por choque térmico. As reações de transformação continham 50 µL de células competentes, 25 µL de tampão de transformação (5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl pH 7.4) e 1 µg de cada DNA. Clones isolados foram selecionados de cada uma das construções, e foram realizadas extrações de DNA plasmidial em pequena escala, utilizando o kit QIAprep Miniprep (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Provas de clivagem enzimática dos genes foram realizadas para confirmar a identidade dos clones, utilizando as enzimas de restrição *Spe* I e *Nco* I (*New England Biolabs*) para clivagem em sítios externos ao gene, e a enzima *Nde* I (*New England Biolabs*) para clivagem em sítios internos a ele. As reações foram realizadas para um volume final de 10 µl contendo 7,5 µl de água Milli-Q, 1x tampão de clivagem, 0,5 µg de cada DNA e 1U das respectivas enzimas. Os produtos das clivagens foram migrados em gel 1% agarose e corados com brometo de etídio, e a identidade de cada sequência foi analisada através do padrão de bandas gerado. Com a identidade de cada clone confirmada, as sequências de interesse foram extraídas do vetor comercial através

de clivagem em larga escala com as enzimas 5' *Spe* I e 3' *Nco* I (*New England Biolabs*), e os fragmentos relativos a cada gene otimizado foram excisados do gel 1% agarose e purificados utilizando o kit comercial QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.3.4 Subclonagem dos genes otimizados no vetor pRSETA de expressão bacteriana

Os genes sintéticos purificados foram subclonados no vetor pRSETA, utilizando o cassete de clonagem inserido na síntese comercial dos genes e sítios enzimáticos pré-existentes no vetor. As reações de ligação entre o vetor e cada um dos genes otimizados, previamente purificados, foram realizadas utilizando duas quantidades diferentes dos fragmentos referentes aos genes sintéticos (1 e 5 µl), mantendo uma concentração definida do vetor (100 ng/reação). O volume final da reação foi de 10 µl em ambos os casos: 1 µl de 10x tampão enzimático (*Ligase Buffer*), 100 ng do vetor linearizado, 0,4 U de T4 DNA Ligase (*New England Biolabs*) e água Milli-Q em quantidade suficiente para o volume final de 10 µl. Reações contendo apenas o vetor linearizado, ou seja, sem os fragmentos sintéticos, foram utilizadas como controles negativos da ligação. As reações foram incubadas a 16 °C, durante 20 h, e em seguida utilizadas para a transformação de células competentes DH10B. As transformações foram realizadas com 50 µl de bactérias competentes, 25 µl de tampão de transformação (5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) e 5 µl de cada reação de ligação.

As bactérias transformadas foram semeadas em placa com meio sólido LB/AMP e incubadas a 37 °C, durante aproximadamente 16 horas. Após esse período, colônias isoladas de cada clone construído foram selecionadas e submetidas à propagação do número de células e extração do DNA plasmidial, utilizando o kit comercial QIAprep Miniprep (Qiagen). A confirmação das subclonagens dos genes otimizados no vetor pRSETA foram realizadas através de provas de clivagem externas, utilizando as enzimas *Nde* I e *Nco* I (*New England Biolabs*) e internas (específicas para cada gene). A reação foi preparada como previamente descrito no item 4.3.3, e incubadas a 37 °C, durante 6 h. Os fragmentos gênicos obtidos foram fracionados em gel 1% agarose e corados com brometo de etídio.

4.4 Expressão e ensaio de solubilidade da proteína expressa

Os plasmídeos comprovadamente ligados aos genes de interesse foram utilizados para transformar bactérias, quimicamente competentes, da linhagem *E. coli* BL21 *Star*

(Invitrogen). Após transformação, as células contendo o plasmídeo pRSETA apresentavam o marcador de seleção de resistência à AMP, por isso foram crescidas em meio LB/AMP. Colônias isoladas de cada construção foram inoculadas em três ml de meio LB/AMP e incubadas a 37 °C, 225 rpm, durante 16 h. Este pré-inóculo foi utilizado para o crescimento em 20 ml de meio LB/AMP, a 37 °C, 225 rpm, até que a cultura atingisse uma DO_{600nm} de aproximadamente 0.8. Após esse ponto, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 1 mM de IPTG, durante 4 h a 37°C. O sedimento celular foi coletado por centrifugação a 4 °C, 8.000 rpm, por 20 minutos, e ressuspensos em Tampão A [50 mM fosfato de sódio (NaH_2PO_4), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0] suplementado com um coquetel de inibidores de protease (Roche). As células foram lisadas através de ultra-sonicação, com seis pulsos de 30 seg, intercalados com um minuto de repouso, e amplitude máxima das ondas ultra-sônicas de 40 kilohertz (kHz). Em seguida, a cada lisado celular foi adicionado 0,01% de Triton-X 100. Os extratos bacterianos foram então homogeneizados e centrifugados a 4 °C, 10000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante obtido após centrifugação, contendo o extrato protéico total solúvel em tampão A, foi coletado e armazenado. Os debris celulares, contendo a fração protéica insolúvel em tampão A, foram ressuspensos em 2x tampão de amostra para eletroforese (2x Laemmli). Tanto a fração solúvel quanto a insolúvel foram checadas em gel de poliacrilamida descontínuo, a fim de determinar em qual delas encontra-se a proteína expressa e estabelecer a estratégia de purificação.

4.5 Purificação protéica por cromatografia de afinidade – protocolo desnaturante

Após determinação da solubidade da proteína recombinante, a purificação dos antígenos fusionados à cauda de histidina foi realizada através de cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA (Qiagen), seguindo o protocolo desnaturante para proteínas insolúveis, expressas como corpúsculos de inclusão nas células bacterianas. O sobrenadante obtido após clareamento do lisado foi desprezado e os debris celulares, onde se encontram os corpúsculos de inclusão contendo as proteínas precipitadas, foram completamente ressuspensos em tampão A', contendo 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 8 Molar (M) uréia, pH 8.0, e deixados por aproximadamente 16 h, a 4 °C, sob agitação. Após esse procedimento, o sobrenadante foi centrifugado (5000 rpm, 5 minutos, 4 °C), filtrado em membrana de nitrocelulose com poros de 0.22 micrômetros (μm), e incubado com resina Ni-NTA por uma hora a 4 °C. A resina foi previamente equilibrada com sucessivas lavagens com tampão A'. Após esse período, nova centrifugação (5000 rpm, um minuto, 4 °C) e três

lavagens com tampão B' foram realizadas (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 8 M uréia, pH 8.0). A proteína recombinante foi eluída com o tampão C' (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0,5 M Imidazol, 8 M uréia, pH 8.0) com três incubações de 30 minutos, sob agitação, a 4 °C. As análises quantitativas foram realizadas através de ensaios de densitometria, utilizando-se como padrão uma curva de Albumina Sérica Bovina – BSA com concentrações previamente estabelecidas. As quantificações foram realizadas através do programa *Kodak Digital Science 1D Image Analysis* (Kodak).

4.6 Renaturação das proteínas NS1 purificadas com o protocolo desnaturante

As proteínas recuperadas a partir de corpúsculos de inclusão apresentam sua estrutura conformacional perdida, uma vez que são solubilizadas através da ação de um agente caotrópico, como o hidrocloreto de guanidina ou a uréia. Dessa forma, importantes epítomos conformacionais são perdidos e a imunogenicidade da proteína consideravelmente prejudicada. Portanto, muitas vezes faz-se necessário submeter as amostras a um processo de renaturação, para retirar o agente caotrópico e possibilitar que a proteína volte a sua conformação nativa. Para tanto, podem ser utilizadas técnicas como diluição, diálise, entre outras. Essa necessidade já foi previamente relatada para as proteínas NS1, com um método de diálise lenta sendo utilizado inicialmente por Wu *et al.* (2003) para retirada da uréia de proteína NS1 expressa em sistema bacteriano e purificada como proteína insolúvel.

Neste trabalho, dois diferentes métodos de renaturação foram utilizados: o primeiro, relatado por Allonso *et al.*, 2011, que trataremos de agora em diante por NS1-ASB. Resumidamente, essa metodologia consiste na lenta diluição da proteína numa ordem de 20 vezes no tampão ASB (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol e 0.1% (w/v) ASB-14), e posterior diálise contra 1x solução fosfato salina (PBS) pH 7.4. No segundo método, por nós desenvolvido, que chamaremos de NS1-Rec, são utilizadas baixas concentrações de proteína para favorecer um bom rendimento (100 µg/ml) e diminuir a precipitação da mesma durante a renaturação. A proteína é dialisada contra um tampão contendo concentrações decrescentes de uréia (6 - 0 M), além de agentes estabilizadores, como baixas concentrações de detergente (0,1% Igepal), 20 mM Hepes pH 7.9, 0,4 M l-arginina, 0,1 mM glutatona reduzida e 1 mM glutatona oxidada, 0,5 mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), 300 mM cloreto de potássio (KCl) e 5 mM MgCl₂.

Para cada metodologia, foram avaliados o rendimento da técnica, aplicação em diagnóstico através de microarranjos líquidos e capacidade de dimerização das proteínas após a renaturação.

4.7 Análises de dicroísmo circular (*Circular Dichroism*, CD) das proteínas NS1 pós-renaturação

Moléculas opticamente ativas, que possuem um centro de assimetria, interagem com a luz circularmente polarizada e provocam alteração na polarização da luz incidente. O dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica não-destrutiva, de fácil manuseio, que detecta essa alteração através da medida da diferença da absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda após esta passar através de uma amostra (GREENFIELD; FASMAN, 1973; WOODY, 1995).

Apesar de fornecer apenas uma imagem de baixa resolução de uma proteína em comparação com outras técnicas, uma série de vantagens tais quais rapidez da medida e não requerimento de amostras altamente concentradas faz do CD uma técnica de uso corriqueiro nos laboratórios envolvidos com análise de proteínas (RAMOS, 2008).

Nas análises de CD, são importantes as ligações amídicas e as estruturas aromáticas das proteínas. As primeiras são responsáveis pelo sinal característico no comprimento de onda (λ) da luz ultravioleta (UV) distante (abaixo de 250 nm), sendo amplamente utilizadas como sondas de estruturas secundárias de proteínas. As estruturas aromáticas das proteínas são responsáveis pelo sinal no ultravioleta próximo (entre 250-300 nm) e são utilizadas para avaliar a estrutura terciária da proteína em questão (WOODY, 1995).

Considerando estas características, a técnica de CD é utilizada para estimar a estrutura secundária de uma determinada proteína e avaliar mudanças conformacionais ocasionadas por ligantes, agentes desnaturantes (acidez, uréia, cloridrato de guanidina, temperatura, etc. (GREENFIELD, 2004). A forma do espectro de CD de uma proteína específica depende da sua estrutura secundária. Isto permite que as proporções de hélices, estruturas beta, alças e estruturas randômicas sejam determinadas. Estudos de sinais característicos de diferentes estruturas secundárias, nos espectros de CD de proteínas, possibilitaram classificá-las em cinco classes (LEVITT; CHOTHIA, 1976):

- 1) principalmente α -hélices,
- 2) principalmente folhas β -pregueadas,
- 3) α hélices + β -folhas (regiões α e β separadas),

- 4) α -hélices/ β -folhas (regiões com α e β misturadas), e
- 5) randômica (predominantemente desordenada).

Espectros de CD das proteínas NS1 foram registrados num espectropolarímetro Jasco J-810, com temperatura controlada por um sistema tipo Peltier 425S PFD. Os espectros foram medidos a uma temperatura de 25 °C. As amostras foram examinadas em cuvetas de 1 cm a uma concentração de proteína de 0.01 μ g/ml, escolhida para manter uma baixa tensão no díndodo na região de comprimento de onda entre 260 e 195 nm.

A concentração de proteína foi determinada utilizando a absorção a 280 nm e o coeficiente de extinção molar de cada proteína, que foi calculado a partir da composição da proteína utilizando a ferramenta Protparam disponível no site SIB - *Swiss Institute of Bioinformatics* (GASTEIGER *et al.*, 2005).

O espectro relatado para cada amostra representa a média de dez espectros individuais para cada preparação, num esquema de escaneamento contínuo numa velocidade de 50 nm por minuto, com uma largura de banda espectral de 1 nm e resposta a cada três segundos, e as leituras foram corrigidas para a contribuição da linha de base da leitura obtida com a amostra 1x PBS pH 7,4 dez vezes diluído. O programa Spectra Manager foi utilizado para processar os dados obtidos.

4.8 Produção de anticorpos tetravalentes contra as proteínas NS1 completas

Para a produção dos anticorpos policlonais tetravalentes específicos contra as proteínas NS1 completas foram utilizados coelhos brancos sadios, com cerca de três meses de idade, mantidos no biotério central do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Para a primeira imunização, uma solução com aproximadamente 100 μ g de proteína total, produzida neste trabalho, após renaturação, sendo 25 μ g de cada proteína NS1 dos quatro sorotipos virais, foi administrada junto com 300 μ l de adjuvante de Freud completo (Sigma). A solução homogeneizada foi injetada nos coelhos, via subcutânea, em seis diferentes pontos. A segunda, terceira e quarta imunizações foram realizadas 15, 30 e 45 dias, respectivamente, após a primeira imunização seguindo o mesmo protocolo da primeira, e com a utilização da forma incompleta do adjuvante de Freud (Sigma). Sete dias após a quarta imunização, os coelhos foram submetidos à sangria total. Cerca de 30 minutos antes do início deste procedimento, os coelhos foram pré-anestesiados com cloridrato de tramadol, um mg por quilo (Kg) e cetoprofeno (dois mg/Kg), por via

subcutânea. Em seguida, os coelhos foram anestesiados com a associação de 2% cloridrato de xilazina (3 mg/Kg) e 10% cloridrato de cetamina (3 mg/Kg), por via intravenosa, utilizando a veia marginal da orelha. Após a anestesia, prosseguiu-se com a punção cardíaca. O sangue coletado foi mantido a 4 °C durante 16 h e, em seguida, centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. Os soros obtidos foram alíquotados e mantidos a -80 °C para posterior purificação. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as exigências do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, de acordo com o protocolo P-014/11 (aprovado por esta comissão, conforme descrição no Anexo A).

4.9 Purificação de anticorpos tetravalentes contra as proteínas NS1 completas e avaliação da resposta imunológica

Os anticorpos foram purificados usando o sistema *Melon™ Gel IgG Purification* (Pierce) para purificação de IgG total, segundo as indicações do fabricante. A matriz fornecida pelo kit liga proteínas séricas abundantes, não-imunoglobulinas, como a albumina e transferrina, usando pH fisiológico, permitindo que os anticorpos presentes na amostra fluam através de um tampão adequado para armazenamento e aplicações posteriores. Para o formato de coluna para microcentrífuga, 100 µl da matriz-gel em suspensão tem a capacidade para purificar até 100 µl de soro. A amostra de soro foi diluída de 1:10 em 1x tampão de purificação *Melon™*. Todas as centrifugações foram realizadas a 4000 x g. A matriz de suporte para purificação e o tampão foram previamente equilibrados, à temperatura ambiente, por aproximadamente 30 minutos. Na coluna para mini-centrífuga foram adicionados 500 µl da matriz de suporte para purificação de IgG. Após o empacotamento da resina, a coluna devidamente colocada em seu tubo descartável foi centrifugada por um minuto. Em seguida, 300 µl do tampão de purificação foram adicionados a matriz, e a matriz foi novamente centrifugada por 10 segundos. Essa lavagem foi realizada mais uma vez. A parte inferior da coluna foi fechada e 500 µl do soro diluído foram adicionados a coluna. A parte superior da coluna foi igualmente fechada e a matriz foi mantida em agitação orbital, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Ao fim da incubação, a parte inferior da coluna foi aberta e a coluna foi inserida no tubo coletor e centrifugada por um minuto. A solução coletada continha os anticorpos purificados e prontos para uso, e foi quantificada por espectrofotometria.

4.10 Aplicações para os anticorpos policlonais anti-NS1 tetravalentes

4.10.1 *Western blot*

A eficiência dos anticorpos policlonais específicos produzidos contra a proteína NS1 dos quatro sorotipos virais, após purificação, foi testada quanto ao reconhecimento das respectivas proteínas que induziram sua formação através de ensaios de *Western blot*. As proteínas recombinantes, antes e após a aplicação dos métodos de renaturação, foram ressuspensas em tampão 2x Laemmli desnaturante, fracionadas em gel gradiente 4-10% poliacrilamida (Invitrogen) e transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando o sistema *iBlot Gel Transfer* (Invitrogen). Após o bloqueio das membranas em solução 1x PBS-5% BSA, as mesmas foram incubadas com os anticorpos policlonais anti-dengue NS1 tetravalentes na diluição de 1:500 em solução 1x PBS-1% BSA, durante aproximadamente 16 horas, sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase na diluição de 1:4000 (*JacksonImmunoResearch*), durante uma hora sob agitação. As membranas foram lavadas três vezes com 1x PBS-0.05% Tween 20, pH 7.4, e a revelação foi realizada através de quimioluminescência utilizando o método colorimétrico *Immuno-Blot Opti-4CN* (BioRad), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.10.2 Elisa de captura para proteína NS1

Inicialmente, foi realizada a titulação do anticorpo anti-dengue NS1 tetravalente produzido em coelho, utilizado como anticorpo de detecção para a proteína NS1 recombinante, visando estabelecer a melhor diluição em ensaios de ELISA. Para tanto, a placa foi sensibilizada com 50 µl/poço de uma solução contendo 10 µg/ml de proteína total, sendo 2.5 µg de cada proteína por sorotipo viral, durante aproximadamente 18 h. A placa foi lavada seis vezes com solução de 1x PBS-0.05% Tween 20, pH 7.4, e bloqueada com 150 µl/poço de 1x PBS-5% leite desnatado durante uma hora. A solução purificada de anti-dengue NS1 tetravalente, quantificada por espectrofotometria, foi submetida a uma curva de titulação, sendo a diluição inicial 1:25, e as diluições subsequentes realizadas utilizando a ordem de 3, em solução de 1x PBS, e 50 µl/poço de cada diluição foram incubados com a placa durante duas horas. Após lavagem da placa por seis vezes com 1x PBS-0.05% Tween 20, pH 7.4, foi realizada uma última incubação com 50 µl/poço de anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado à enzima peroxidase (*Jackson ImmunoResearch*), na diluição de 1:4000, durante

uma hora. Após seis lavagens com tampão 1x PBS-0,05% Tween 20, pH 7.4, as placas foram incubadas com 50 µl/poço da solução substrato da enzima peroxidase 1-Step Turbo TMB-ELISA (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, TMB, Thermo Scientific). Após aproximadamente 20 minutos, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µl de solução de parada (2 Normal ácido sulfúrico). A DO foi medida a 450 nm, com comprimento de onda de referência de 620 nm, em leitor de ELISA (Power Wave, BioTek).

Para padronizar o ensaio de captura para a proteína NS1, foi necessário escolher um segundo anticorpo, produzido em um hospedeiro diferente de coelho, a ser utilizado como anticorpo de captura para a proteína NS1. Depois de testar diferentes combinações, o anticorpo anti-glicoproteína NS1 de dengue vírus [DN3], produzido em camundongo (Abcam, catálogo ab41616), foi selecionado. Foi estabelecida a diluição de trabalho a ser aplicada (1:5, em 1x PBS, pH 7.4). Microplacas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas durante aproximadamente 18 h, a 4 °C. Após esse período, todas as incubações foram realizadas a 37 °C. O sobrenadante foi desprezado e as placas lavadas seis vezes com tampão 1x PBS-0,05% Tween 20, pH 7.4, os poços foram bloqueados com 75 µl de solução de 1x PBS-2% leite, pH 7.4, por uma hora. As placas foram novamente lavadas com 1x PBS-0,5% Tween 20, pH 7.4 seis vezes. Os poços foram expostos a 25 µl de solução do antígeno, uma curva de diluição da proteína NS1 recombinante (uma mistura da proteína NS1 dos quatro sorotipos virais) diluída em 1x PBS, pH 7.4 durante duas horas. A curva foi construída com sete pontos de diluição utilizando ordem de 3, sendo a concentração inicial de proteína de 10 µg/ml. Dessa forma, se poderia construir um ensaio quantitativo da proteína. Após nova lavagem da placa, o anti-NS1 policlonal produzido em coelhos neste trabalho foi utilizado como anticorpo de detecção na diluição de 1:500, diluído em PBS pH 7.4, durante uma hora de incubação. Juntamente com a curva de quantificação da solução contendo as quatro proteínas de todos os sorotipos virais, foram realizadas sob as mesmas condições, curvas de quantificação para cada proteína, individualmente.

A curva de quantificação da proteína NS1 foi utilizada em ensaios de detecção e quantificação da proteína NS1 em sobrenadante de cultura de diferentes linhagens celulares, gentilmente cedidos pelo Dr. Eduardo Nascimento (*University of Pittsburgh*), infectadas com o vírus DENV 2 cepa 16681 Thai e DENV 3 cepa H-87.

4.10.3 Imunofluorescência indireta

O anticorpo policlonal anti-dengue NS1 tetravalente produzido em coelho foi utilizado em ensaios de imunofluorescência indireta, para verificar se o mesmo era capaz de reconhecer a proteína nativa produzida pelo próprio vírus. Os quatro sorotipos virais foram testados:

- Células Vero
- * DENV 1 cepa Hawaii;
- * DENV 2 cepa 16681 Thai;
- * DENV 3 cepa H-87;
- * DENV 4 cepa H241.

(Cepas gentilmente cedidas pelo Dr. Jared D. Evans, PhD (*University of Pittsburgh*)).

- Células C6/36

- *DENV1 cepa PE/97-42735;
- *DENV2 cepa PE/95-3808;
- * DENV3 cepa PE/02-95016;

*DENV 4 - isolado em Roraima (Boa Vista) em 1981, doação do Instituto Evandro Chagas, Belém, PA.

(Cepas gentilmente cedidas pela Dra. Marli Tenório – Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE, FIOCRUZ)).

Células de mamífero (Vero) foram semeadas no meio de crescimento *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) completo (Cellgro/Mediatech) acrescido de 10% soro fetal bovino (SFB) termicamente inativado (Hyclone), 1% Penicilina-Streptamicina (Gibco) e 1% aminoácidos não-essenciais (Gibco) utilizando frascos T75 (Corning). Cerca de um milhão de células por frasco foram mantidas em crescimento a 37 °C, 5% dióxido de carbono (CO₂) para expansão celular. As células foram lavadas brevemente por duas vezes com 1x PBS pH 7.4 e tripsinizadas (0.25% Tripsina, Gibco) a 37 °C, 5% CO₂. As células foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de seis poços (Falcon). Uma lamínula (*coverslips Poly-D-Lysine/Mouse Laminin* 12 milímetros, BD) e cerca de 500.000 células foram colocadas por poço, juntamente com dois ml de meio de crescimento completo. A cultura foi mantida durante 24 h a 37 °C, 5% de CO₂.

A infecção pelos quatro sorotipos de DENV foi realizada como segue: As células foram brevemente lavadas com 1x PBS, pH 7.4 e submetidas ao contato com o vírus,

utilizando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1. As células foram incubadas com o meio de infecção DMEM acrescido de 2% SFB, 1% Pen-Strep e 1% aminoácidos não-essenciais. Como controle da reação, células não infectadas foram mantidas em contato com o meio DMEM contendo 2% SFB e 25 mM HEPES, na ausência do vírus. As células foram incubadas por uma hora e meia, agitando-se levemente a placa a cada 20 minutos. Por fim, as células foram lavadas com o meio de infecção brevemente por duas vezes, e deixadas em crescimento a 37 °C, 5% CO₂ com dois ml de meio de infecção por poço, durante 48 horas. Os poços foram lavados brevemente com 1x PBS, pH 7.4 e as células foram fixadas nas lamínulas com 4% formaldeído (PFA) por 10 minutos, em seguida lavadas por mais duas vezes com 1x PBS, pH 7.4 e mantidas a 4 °C.

Lamínulas DENV+ para cada sorotipo e lamínulas DENV- foram bloqueadas com tampão de bloqueio (1x PBS, pH 7.4, 3% BSA, 100 mM Glicina, 10% SFB, 0,5% Saponina) por 30 minutos e incubadas com os anticorpos primários: 1) anti-dengue NS1 tetravalente na diluição de 1:20 e/ou o anticorpo comercial Anti-Dengue Virus Complex, clone D3-2H2-9-21 – Anticorpo 2H2 (Millipore), na diluição de 1:50, durante uma hora e meia, à temperatura ambiente. Como controles de isotipo, foram utilizados os anticorpos *Purified Rabbit IgG* (catálogo 02-6102, Invitrogen) e Mouse IgG2a, κ Isotype Control (catálogo 553454, BD Biosciences) na mesma concentração de anticorpos utilizada para os anticorpos anti-dengue NS1 de coelho e 2H2 de camundongo, respectivamente. As lamínulas foram lavadas brevemente em 1x PBS pH 7.4 e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado a Alexa Fluor 594 (Invitrogen / Molecular Probes) e anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen / Molecular Probes), por uma hora à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As lamínulas foram novamente lavadas em 1x PBS, pH 7.4 e montadas em lâminas com meio de montagem *ProLong Antifade Kit* (Invitrogen). Para leitura das reações, foi utilizado o microscópio de fluorescência Zeiss Imager M1 AX10.

Para testar o anticorpo anti-dengue NS1 tetravalente produzido em coelho contra a proteína NS1 produzida em células de inseto, foram utilizadas células de *A. albopictus*, clone C6/36, em meio de cultura Leibowitz-15 (L15, Cellgro/Mediatech), suplementado com 10% SFB termicamente inativado, 1% aminoácidos não-essenciais, 10% solução de triptose fosfato, 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina. As cepas virais foram inoculadas e os tubos, com as culturas infectadas, foram incubados em estufa a 28 °C. Após quatro dias, as culturas que apresentaram efeito citopático foram submetidas a imunofluorescência utilizando o anti-dengue NS1 tetravalente produzido em coelho. Células

não-infectadas foram também submetidas ao mesmo tratamento, como controles negativos. Os tubos com as células infectadas foram vigorosamente misturados e o material foi passado para um tubo de 50 ml (Falcon) e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente para não perturbar o botão de células, que foi ressuspenso em 300 µl de 1x PBS, pH 7.4, e essa suspensão foi utilizada para preparar as lâminas. As lâminas foram deixadas secar a temperatura ambiente e fixadas em acetona gelada por 15 minutos, a -20 °C e novamente deixadas secar à temperatura ambiente. O anticorpo primário (anti-dengue NS1 tetravalente) foi diluído em tampão 1x PBS, pH 7.4 para a diluição de 1:500. O soro pré-imune também foi testado em cultura de células infectadas, nas mesmas diluições. A incubação foi realizada a 37 °C, em câmara úmida, durante uma hora. As lâminas foram lavadas sucessivamente por cinco minutos em água destilada, cinco minutos em 1x PBS pH 7.4 e cinco minutos em água destilada. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho FITC-Alexa 488 produzido em cabra (Invitrogen) diluído de 1:100 em 1x PBS, pH 7.4, a 37 °C em câmara úmida por uma hora. As lâminas foram lavadas sucessivamente por cinco minutos em água destilada, cinco minutos em 1x PBS pH 7.4 e cinco minutos em água destilada, incubadas com solução de Azul de Evans por cinco minutos e secas a temperatura ambiente. Uma solução aquosa de glicerol 50% foi adicionada a cada preparação, que foi coberta com a lamínula e direcionada para leitura em microscópio de fluorescência Zeiss Imager M1 AX10.

4.10.4 Citometria de fluxo para identificação de células infectadas através de marcação intracitoplasmática de proteínas de DENV

O procedimento de infecção utilizado para células Vero no tópico 4.9.3 foi utilizado para infecção de células HepG2 com DENV2, cepa Thai 16681. Dois milhões de células HepG2 foram colocadas em frascos T75 e mantidas em meio de crescimento completo *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640), acrescido de 10% SFB, 1% Penicilina/Streptamicina, 1% aminoácidos não-essenciais, 1% piruvato de sódio e 1% 100x solução *Minimum Essential Medium* (MEM) *Vitamin*. As células foram semeadas em placas de seis poços (cerca de 500.000 células por poço) com dois ml de meio de crescimento e mantidas a 37 °C, 5% CO₂, durante aproximadamente 18 horas. As células foram lavadas com 1x PBS, pH 7.4 brevemente, por duas vezes, e expostas ao vírus (MOI 1) por uma hora e meia a 37 °C, 5% CO₂. Como controle negativo da infecção foi usado meio sem o vírus.

Durante a infecção as células foram suavemente agitadas a cada 20 minutos, até o final da exposição. Em seguida, as células foram lavadas com 1x PBS, pH 7.4 e mantidas a 37 °C, 5% CO₂, por 96 h. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1x PBS, pH 7.4 e incubadas com um ml de 1x PBS, pH 7.4, sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ mas contendo 5 mM de etileno-diamino-tetra-acetato (EDTA), para favorecer o desprendimento da placa de cultura sem a necessidade de remoção física (*cell scraper*) ou enzimática. As células foram coletadas da placa e lavadas uma vez com 1x PBS, pH 7.4 e duas vezes com tampão FACS (1x PBS, pH 7.4 contendo 2% SFB e 0.1% azida sódica). Em seguida, as células foram coradas com o marcador de células vivas e mortas (*Live/Dead Fixable blue dead cell staining kit*, BD Biosciences) e depois fixadas com o kit *BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization* (BD Biosciences). As células foram submetidas a marcação por 30 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo comercial 2H2 (IgG2a de camundongo reativo contra a proteína prM de todos os sorotipos de dengue), concomitantemente com anticorpo IgG de coelho anti-dengue NS1 tetravalente.

Em seguida, as células foram coradas com IgG de cabra anti IgG2a de camundongo conjugado com Alexa fluor 488 e com IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao APC-Cy7, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Novamente foi realizada uma lavagem com tampão FACS e a leitura foi realizada no citômetro de fluxo LSR II (BD Biosciences) utilizando o programa FACS Diva (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o programa Flowjo versão 8.8.7 (Tree Star, Inc). Para análise foram consideradas apenas as células individuais e vivas.

- Para classificação:

As células foram coradas com 7-aminoactinomicina-D (Sigma) durante 20 minutos a 4 °C, e posteriormente lavadas com tampão FACS. As células foram mantidas em *BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit* (BD Biosciences), enquanto a coloração para FACS estava sendo processada.

- FACS:

As células (infectadas ou não-infectadas) foram incubadas por 20 minutos a 4 °C com os anticorpos: 1) Anti-dengue NS1 tetravalente produzido em coelho; 2) Anticorpo 2H2 produzido em camundongo (Millipore). Como controle de isotipo, foram utilizados os anticorpos *Mouse IgG2a, κ Isotype Control* (catálogo 553454, BD Biosciences e *Purified Rabbit IgG* (catálogo 02-6102, Invitrogen) na mesma concentração dos anticorpos-teste.

As células foram lavadas com tampão FACS e coradas com o *kit Live/Dead Fixable Blue Dead Cell* (Invitrogen), durante 20 minutos a 4 °C. Em seguida foi realizada uma nova lavagem com o tampão FACS e as células foram incubadas com o tampão de permeabilização (enquanto as células classificadas estavam em repouso), durante 20 minutos, a 4 °C. Neste ponto, o tratamento foi realizado nas células para classificação.

- FACS/Classificação:

As células foram lavadas duas vezes com o tampão do kit de permeabilização. Para a coloração intracelular, as células foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos, à temperatura ambiente, e coradas com cinco mg de anti-pan Dengue (2H2) conjugado com *mouse Zenon IgG2a Pacific Blue* (Invitrogen/Molecular Probes). Para 1 mg de anticorpo, foram usados cinco µl de Zenon por cinco minutos e realizado o bloqueio com cinco µl (para cada mg) utilizando a solução *Zenon mouse Blocking* (Invitrogen/Molecular Probes).

As células para controle de isotipo foram incubadas com cinco mg de cada um dos seguintes: 1) *Isotype rabbit IgG* (Invitrogen) e 2) *Isotype control mouse Pacific Blue IgG2a* (BD Pharmingen). As células foram lavadas em tampão de permeabilização e a leitura foi realizada no Citômetro de fluxo BD LSRII (BD Biosciences).

4.11 Validação da imunogenicidade dos antígenos recombinantes através da técnica de microarranjos líquidos

No intuito de avaliar a imunogenicidade dos antígenos produzidos, bem como determinar sua sensibilidade e especificidade, foram realizados ensaios de microarranjos líquidos. Neste sistema, microesferas (Luminex Corporation) de 6 µm de diâmetro são coradas internamente com diferentes proporções de dois fluorocromos espectralmente distintos. Desta forma, podem ser criados até 100 diferentes códigos de cor para as microesferas. Inicialmente, 0.625×10^6 microesferas foram ressuspensas e sonicadas para garantir uma distribuição homogênea. A suspensão de microesferas foi lavada duas vezes com tampão de ativação (100 mM NaH₂PO₄, pH 6.2) e ressuspensa em 80 µl deste mesmo tampão. Em seguida, 10 µl de cada solução, Sulfo-NHS (sulfo-N-hidroxissuccinimida - Pierce) e EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida - Pierce), ambas diluídas para a concentração final de 50 mg/ml em água Milli-Q, foram adicionadas respectivamente nessa ordem para estabilizar a reação e ativar as microesferas. As microesferas foram incubadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 20 minutos. Durante esta etapa, o EDC reage

com os grupos carboxil (-COOH) na superfície das microesferas (SILVA *et al.*, 2003; GRABAREK e GERGELY, 1990) para formar aminas reativas O-acylisourea como intermediárias (SINZ, 2003). Em seguida, na presença de Sulfo-NHS, os grupos carboxil são convertidos em ésteres de aminas reativas Sulfo-NHS (BIAGINI *et al.*, 2004; NYMAN *et al.*, 2002; STAROS *et al.*, 1986; WITT *et al.*, 2004), as quais permitirão o posterior acoplamento das proteínas à superfície carboxilada das microesferas.

As microesferas ativadas foram subsequentemente lavadas com 1x PBS, pH 7.4. Após as lavagens, as microesferas foram covalentemente acopladas a diferentes concentrações dos antígenos (25 a 100 µg/ml), diluídos em 1x PBS, pH 7.4, e incubadas a 37 °C/225 rpm ao abrigo da luz por duas horas. Nesta etapa, as aminas primárias (-NH₂) das proteínas a serem acopladas substituem os ésteres -NHS na superfície das microesferas, formando a ligação covalente via pontes peptídicas (QIAGEN, 2006). Após o acoplamento, as microesferas foram lavadas duas vezes com 100 µl de tampão de bloqueio (1x PBS, pH 7.4, 1% BSA), ressuspendidas em 200 µl deste mesmo tampão e quantificadas através do contador automático *Vi-Cell Analyser* (Beckman Coulter).

A solução com as microesferas foi diluída para a concentração de 40 mil microesferas/ml, sendo utilizadas 2.500 microesferas por poço (placa de 96 poços com poros, Millipore). Os soros de pacientes foram diluídos para a concentração final de 1:100 e incubados com as microesferas a 37 °C, 225 rpm, ao abrigo da luz por 15 minutos. Após duas lavagens com 100 µl de tampão de lavagem (1x PBS, pH 7.4, 1% BSA), a placa foi incubada com 100 µl do anticorpo anti-Ig total humano biotilado (*JacksonImmunoResearch*) na diluição de 1:1000 por 15 minutos, 37 °C, 225 rpm. Após mais duas lavagens, as microesferas foram incubadas com o anticorpo anti-biotina conjugado a ficoeritrina (anti-biotina PE, clone BK-1/39, eBioscience) na diluição de 1:150, na temperatura de 37 °C, 225 rpm, ao abrigo da luz durante 15 minutos. As microesferas foram lavadas mais uma vez com tampão de lavagem, suspendidas em 100 µl deste mesmo tampão, e a placa submetida à leitura de fluorescência pelo equipamento Luminex 200 (Luminex Corporation).

Nesse sistema, milhares de microesferas são analisadas individualmente por dois *lasers* de comprimentos de onda distintos, sendo um vermelho (635nm), que identifica a esfera de acordo com seu código de cor, e o outro verde (532nm), o qual excita a ficoeritrina quantificando a reação que ocorreu na superfície da esfera. A fluorescência emitida pela ficoeritrina, expressa como Intensidade de Fluorescência Média - MFI, foi considerada válida quando a contagem das microesferas atingiu o número mínimo de 50 esferas de cada

identidade por poço da placa. A MFI para cada amostra foi obtida a partir da subtração da MFI da reação de fundo (*background*) da reação (poços sem soro adicionado).

Para estes ensaios, além das proteínas produzidas neste trabalho, foram testadas (seguindo a mesma metodologia) diversos antígenos comerciais (construções quiméricas e proteínas completas) das proteínas ENV dos quatro sorotipos virais, obtidas nas empresas MyBioSource e Prospec.

Com a finalidade de determinar os valores de ponto de corte (*cut-off*) e a performance diagnóstica dos antígenos produzidos, os dados gerados foram submetidos à análise estatística da curva *Receiver Operating Characteristic* – ROC (GRINER *et al.*, 1981; METZ, 1978; ZWEIG; CAMPBELL, 1993). Estas análises foram realizadas através do programa MedCalc versão 11.4.4, seguindo a metodologia de DeLong *et al.* (1988). O cálculo da área sob a curva foi realizado assumindo um intervalo de confiança de 95%, e a seleção do *cut-off* foi feita a partir do par sensibilidade/especificidade que apresentou maior acurácia (mínimo de resultados falsos positivos e falsos negativos).

4.12 Coorte sorológica

A coorte sorológica utilizada neste trabalho está descrita em detalhes no trabalho de Melo e outros (2011). De setembro de 2005 a março de 2007, 238 indivíduos que foram vacinados pela primeira vez contra o vírus da febre amarela utilizando a cepa YFV-17DD foram matriculados nesta coorte na cidade de Recife, Brasil. Todos os indivíduos participantes eram saudáveis e possuíam mais de 10 anos de idade, e estavam sendo imunizados pela primeira vez com a vacina YFV-17DD (Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil). Para cada indivíduo, as primeiras três amostras de soro colhidas foram testadas por imunoenensaio enzimático para detecção de IgM (MAC-ELISA) e IgG (GAC-ELISA) e por um ELISA indireto para determinar os níveis de IgM e IgG contra o vírus da febre amarela, antes e após a imunização. Além disso, todas as amostras de soro recolhidas foram testadas para anticorpos anti-DENV IgG para estudar a reatividade cruzada com YFV. Dessa forma, para as amostras desta coorte temos os valores detectados para anticorpos contra ambos os vírus DENV e febre amarela.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos de imunização de coelhos para a obtenção de anticorpos policlonais foram realizados de acordo com as exigências do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, CPqAM, FIOCRUZ), de acordo com o protocolo P-014/11, aprovado por esta comissão (Anexo A).

Os painéis sorológicos contendo amostras comprovadamente positivas e negativas para dengue, além de amostras de pacientes vacinados contra febre amarela - IgG positivos para febre amarela, um flavivírus estritamente relacionado com o vírus da dengue, foram obtidos a partir da coorte de amostras humanas disponível no LaViTE do CPqAM/FIOCRUZ (MELO *et al*, 2011). A utilização dessas amostras em nossos ensaios foi viabilizada pela aprovação no Comitê Nacional de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CONEP, Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, registro nº 12138), conforme descrito no anexo B. Todos os dados foram tratados de forma confidencial e anônima.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Seleção das seqüências e construção dos antígenos recombinantes

As seqüências codificantes para as proteínas ENV e NS1, dos quatro sorotipos virais, foram selecionadas a partir de isolados do Brasil e da América do Sul. Tendo em vista que os kits de diagnóstico comercialmente disponíveis (quadro 1) são geralmente baseados em cepas virais isoladas a partir de infecções em outras regiões do globo, a seleção de seqüências antigênicas de isolados locais visou aumentar a sensibilidade dos ensaios imunológicos no reconhecimento do repertório de anticorpos da nossa população.

Quadro 1 - Diversos kits de diagnóstico, comercialmente disponíveis no mercado, para detecção de anticorpos anti-DENV.

"Kits" comerciais	Isotipo de Ig detectado	Formato
PanBio Dengue Duo	IgM / IgG	ELISA
PanBio Dengue rapid test	IgM / IgG	Teste imunocromatográfico
MRL Diagnostic Dengue	IgM	ELISA
Blot IgM™, Diagnostic Biotechnology Ltd.	IgM	Immunoblot
Venture Technologies Dengue IgM and IgG Dot Blot	IgM / IgG	Immunoblot
Integrated Diagnostics	IgM	Teste imunocromatográfico
Dengue Duo Rapid Strip Test, PanBio	IgM / IgG	Teste imunocromatográfico
UMELISA Dengue IgM	IgM	Ultramicro-ELISA
PanBio Dengue IgG Capture ELISA	IgG anti-NS1	ELISA
PLATELIA™ Dengue NS1 Ag, BIO-RAD	IgM anti-NS1	MAC-ELISA

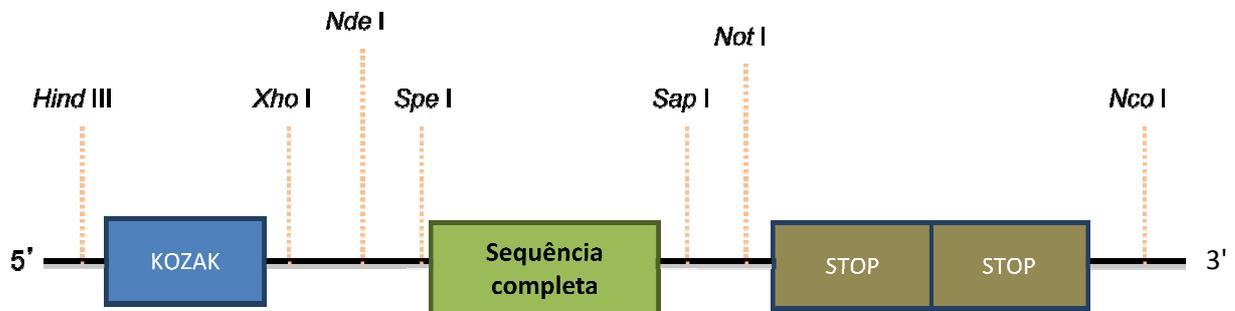
Nota: O Brasil importa e distribui para a rede de Saúde os kits da empresa panBio Diagnostics. Fonte: Modificado de Guzman e Kouri (2004).

Estudos evolutivos de DENV têm revelado que a sua diversidade genética está aumentando cada vez mais com o passar dos anos (HOLMES e BURCH, 2000), um fator que é fortemente influenciado pela alta variabilidade genética a que estão sujeitos os vírus de RNA. Isso tem implicação direta no entendimento da resposta imunológica do hospedeiro ao vírus, no desenvolvimento de vacinas e no campo de diagnóstico (HOLMES, 2006). O alinhamento de todas as seqüências rastreadas, por sorotipo, levou a definição de quatro seqüências consensos para ENV e para NS1.

Essas seqüências consenso foram fusionadas a dois sítios múltiplos de clonagem (5'-*Hind* III, *Xho* I, *Nde* I, *Spe* I e 3' – *Sap* I, *Not* I, *Nco* I), como representado na figura 15, para

permitir a posterior construção dos vetores de expressão, através de estratégias de subclonagem.

para flanquear os genes



I. A montante, sítios para nos sistemas de expressão é adicionada ao cassete de genes em sistema eucarioto. O proteica em caso de erro ar a clonagem do gene de

Com a utilização dessa estratégia, o gene de interesse após síntese pode ser facilmente clonado em diferentes vetores de expressão, procariotos e eucariotos, previamente selecionados. São eles: *Hind* III/*Nco* I (pKLactis – expressão intracelular em levedura); *Xho* I/*Nco* I (pKLactis – expressão em levedura, secreção extracelular); *Nde* I/*Sap* I (pTXB1 – expressão em bactéria, fusionada a um *tag* de inteína C-terminal); *Spe* I/*Nco* I (pPal7 - expressão em bactéria, com um *tag proffinity* N-terminal); *Xho* I/*Not* I (pET21D – expressão em bactéria, com proteína fusionada a uma cauda de His C-terminal) e *Spe* I/*Nco* I (pRSETA – expressão em bactéria, com proteína fusionada a uma cauda de His N-terminal). O cassete de clonagem foi cuidadosamente elaborado para que o corte com as enzimas específicas, para cada vetor, preservasse as sequências necessárias para as estratégias de clonagem a serem utilizadas. Para os vetores de expressão em células eucariotas, por exemplo, a sequência Kozak de ligação ao ribossomo é preservada, ao contrário do que acontece com o gene para ser clonado em vetores procariotos, que possuem a sequência SD para o reconhecimento ribossomal. Os dois códons de terminação (*stop*) para garantir a terminação adequada da proteína recombinante são excluídos das proteínas expressas com algum ligante C-terminal, como no caso da clonagem em pET21D e pTXB1.

Para este trabalho, foi selecionado o plasmídeo de expressão bacteriano pRSETA (Invitrogen), um vetor pUC derivado, com alto nível de expressão proteica devido à presença do forte promotor T7. As proteínas expressas nesse vetor são facilmente purificadas por serem

expressas fusionadas a uma cauda de His N-terminal, através do uso de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. As resinas para purificação são matrizes altamente reticuladas de 6% agarose ligadas ao ácido nitrilotriacético (NTA), um quelante tetradentado. O NTA liga-se ao íon níquel (Ni^{2+}) por quatro sítios de coordenação. Os íons metálicos interagem com o nitrogênio aromático dos grupamentos imidazol de cada aminoácido da cauda de histidina, ligando a proteína à resina de purificação. Usando Ni-NTA agarose, as proteínas podem ser purificadas sob condições nativas, de desnaturação, ou condições híbridas. Proteínas ligadas à resina são eluídas com tampões de pH baixo ou por competição com imidazol ou histidina. As proteínas resultantes estão prontas para uso nas aplicações alvo.

A produção de antígenos recombinantes para as mais diversas aplicações, incluindo produção de antígenos com finalidade diagnóstica, vem sendo realizada em diversos sistemas de expressão. Dentre estes, os mais difundidos e aplicados são *E. coli* (GUPTA *et al.*, 2001; HANNIG; MAKRIDES, 1998; JANA; DEB, 2005; NUC; NUC, 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (BITTER; EGAN, 1984; MUMBERG *et al.*, 1995; ROSE; BROACH, 1990), *Pichia pastoris* (BORNERT *et al.*, 2012; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005); células de *Drosophila melanogaster* S2 (BRILLET *et al.*, 2010; PERRET *et al.*, 2003), baculovírus (CARMO *et al.*, 2012; PALOMARES *et al.*, 2012) e adenovírus (COTTINGHAM *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2011).

Podemos citar como exemplo inúmeros trabalhos utilizando alguns destes sistemas para produção de proteínas NS1 e ENV recombinantes de DENV, como expressão em levedura, vírus de vacínia, baculovírus e outras células de insetos (FALGOUT *et al.*, 1989; FALGOUT; MARKOFF, 1995; PRYOR; WRIGHT, 1993; PRYOR; WRIGHT, 1994, WALLIS *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 1986; ZHOU *et al.*, 2006). Como todos esses sistemas são complexos, a manipulação e otimização dos protocolos de expressão são bastante laboriosos e apresentam um custo final de produção relativamente alto.

O sistema de expressão utilizando *E. coli* continua a dominar, entre os sistemas de expressão bacterianos, sendo o sistema preferido para investigações laboratoriais e desenvolvimento inicial de atividades comerciais, considerado um ponto de referência útil para a comparação entre diferentes plataformas de expressão (CHEN, 2011). Aproximadamente 30% das proteínas terapêuticas recombinantes atualmente, aprovadas para comércio, são produzidas em *E. coli*. Devido a sua genética bem caracterizada, crescimento rápido e alto rendimento de produção, a *E. coli* tem se mantido como a principal escolha para a expressão de proteínas não-glicosiladas na indústria de biotecnologia, e os constantes

avanços na descoberta de facilitadores para expressão de proteínas (não-necessidade de um sistema de seleção por antibiótico, engenharia de novas cepas contendo características de interesse para a indústria, sistema de N-glicosilação bacteriano, entre outros) possibilitam que proteínas cada vez maiores, mais complexas, incluindo glicoproteínas humanizadas, possam ser produzidas em larga escala em sistemas bacterianos (HUANG; LIN; YANG, 2012).

6.2 Otimização e síntese das sequências de DNA para expressão em células procarióticas

A expressão de proteínas recombinantes é importante em diferentes níveis da pesquisa biológica. O custo de produção de biofármacos e reagentes de investigação depende, em grande parte, dos níveis de expressão de proteína que podem ser alcançados, que podem ser fortemente prejudicados pela diferença entre os sistemas de expressão do organismo doador do gene e do organismo hospedeiro utilizado para produção (WELCH *et al.*, 2009). Construções genéticas usando DNA sintético vêm sendo cada vez mais utilizadas devido a maior disponibilidade de sequências em bancos de dados (VENTER, 2004) e a velocidade da obtenção das sequências construídas, que podem conter as modificações desejadas pelo pesquisador, com um relativo baixo custo de produção (WELCH *et al.*, 2009).

Associada a facilidade de produzir o gene sinteticamente, vem atrelada a vantagem de, simultaneamente promover a otimização da sequência heteróloga para expressão no organismo alvo, no caso *E. coli*. Os problemas que ainda envolvem a expressão de antígenos heterólogos em bactérias (perda de modificações pós-traducionais, alteração de conformação, exposição de epítomos e imunogenicidade) são exacerbados pela diferença de sistemas de expressão, com destaque para as preferências por usos de códons genéticos (*codon usage*) para tradução proteica de cada organismo (AUEWARAKUL, 2005; CHEN, 2011; HATFIELD; ROTH, 2007; WELCH *et al.*, 2009). A baixa concentração de RNA transportadores (RNAt) direcionados para os códons menos utilizados por bactérias age como fator limitante do nível de expressão, com interrupção prematura da tradução, formação de proteínas truncadas, mudanças do quadro de leitura, instabilidade do RNA e adição de aminoácidos incorretos (BANEYX, 1999; KURLAND; GALLANT, 1996; RAMAKRISHNA *et al.*, 2004; TSUCHIHASHI; BROWN, 1992; WELCH *et al.*, 2009).

Diversos grupos tentam superar essa limitação utilizando cepas de bactérias enriquecidas com RNAt para códons raros (BRINKMANN *et al.*, 1989; CARSTENS *et al.*, 2001) ou coexpressão de genes que codificam para RNAt raros em *E. coli* (GROTE *et al.*, 2005; KERRIGAN *et al.*, 2008). No entanto, estudos realizados por Burgess-Brown e outros

(2008) comparando a suplementação de códons raros com a otimização gênica mostraram que esta última afeta uma maior proporção de genes que a suplementação de RNAt, além de proporcionar uma expressão mais eficiente.

As sequências selecionadas neste trabalho, das proteínas ENV e NS1, foram otimizadas utilizando o algoritmo genético do programa LETO 1.0 (Entelechon). Vários parâmetros que interferem na tradução protéica foram analisados simultaneamente, como *codon usage*, estrutura secundária do RNA mensageiro (RNAm), distribuição do conteúdo de GC, motivos repetitivos de DNA, ORFs secundárias, sítios internos de restrição, entre outros, visando aumentar a eficiência de transcrição do RNAm, a estabilidade e a tradução do RNA em sistemas bacterianos.

Para tanto, as sequências foram modificadas através de mutações pontuais silenciosas que apenas alteraram a trinca de DNA a ser reconhecida pelo ribossomo durante a tradução, mas não o aminoácido adicionado, de forma a preservar a sequência aminoacídica e aumentar simultaneamente o nível da expressão. A região do cassete de clonagem foi preservada para não sofrer alterações no processo de otimização, preservando os sítios de enzimas de restrição necessários para as posteriores estratégias de clonagens.

As figuras 16 e 17 ilustram o processo de otimização de *codon usage* para as sequências de dengue ENV sorotipo 1 (aminoácido leucina) e NS1 sorotipo 1 (aminoácido alanina) para expressão em bactéria, exemplificando a alteração de códons utilizados para expressar cada aminoácido. O mesmo processo foi realizado para todos os outros aminoácidos em todas as sequências.

Figura 15 - Otimização de *codon usage* para o aminoácido leucina na sequência ENV sorotipo 1.

2.2.10 L - Leucine:

Codon	Original	Target	Optimized
UUA	31.9 %	25.0 %	23.4 %
UUG	17.0 %	29.0 %	27.7 %
CUU	8.5 %	17.0 %	17.0 %
CUC	17.0 %	0.0 %	2.1 %
CUA	17.0 %	0.0 %	0.0 %
CUG	8.5 %	29.0 %	29.8 %

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Esta é uma comparação da frequência de códons para o aminoácido leucina (UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG) da sequência original *versus* a sequência otimizada (*optimized*). Como referência, o uso dos códons do organismo-alvo é incluído (*target*). Os gráficos indicam a soma do desvio a partir do uso de códons para a sequência original (barra azul) e a otimizada (barra verde). Barras verdes inferiores às azuis indicam uma melhor adequação com o uso de códons para o organismo alvo visando melhorar a eficiência de expressão da proteína DENV ENV sorotipo 1 em *E. coli*.

Figura 16 - Otimização de *codon usage* para o aminoácido alanina da sequência NS1 sorotipo 1.

2.2.1 A - Alanine:



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Esta é uma comparação da frequência de códons para o aminoácido alanina (GCU, GCC, GCA e GCG) entre a sequência original *versus* a sequência otimizada (*optimized*). Como referência, o uso dos códons do organismo-alvo é incluído (*target*). Os gráficos indicam a soma do desvio a partir do uso de códons para a sequência original (barra azul) e a otimizada (barra verde). Barras verdes inferiores às azuis indicam uma melhor adequação com o uso de códons para o organismo alvo visando melhorar a eficiência de expressão da proteína DENV NS1 sorotipo 1 em *Escherichia coli*.

Os seis códons para expressar leucina (UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG) e os quatro códons possíveis para expressar o aminoácido alanina (GCU, GCC, GCA e GCG) são utilizados em diferentes frequências pelo vírus (original) e o organismo alvo (células bacterianas). Além disso, *E. coli* utiliza apenas quatro códons (UUA, UUG, CUU, CUG) para expressar leucina e três códons (GCU, GCC e GCA) para alanina. Isso justifica ainda mais a necessidade de modificar a sequência original através de mutações silenciosas para aumentar o nível de expressão protéico em bactérias, evitando possíveis paradas no processo traducional e consequente produção de proteínas truncadas.

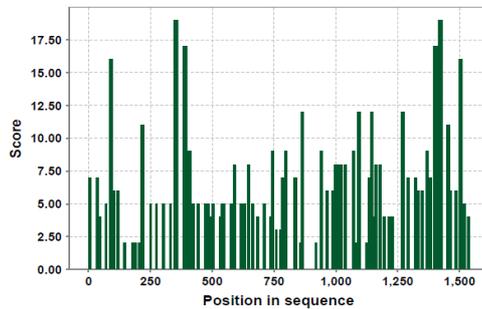
A eficácia e aplicabilidade dessa estratégia é defendida em diversos trabalhos, como Zhou *et al.* (2004), através da expressão de um candidato vacinal recombinante contra *Plasmodium falciparum*, e Griswold *et al.* (2003) na expressão de cutinase de *Fusarium solani*, ambos os trabalhos utilizando como sistema de expressão *E. coli*.

Como exemplificado na figura 18 e 19 com as sequências dos genes DENV ENV sorotipo 3 e DENV NS1 sorotipo 1, a estrutura secundária ao nível de RNAm foi otimizada para todas as demais sequências utilizadas nesse trabalho.

Figura 17 - Otimização de estrutura secundária de RNAm para a sequência ENV sorotipo 3.

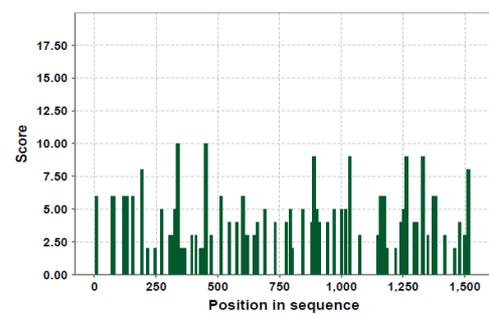
2.3.1 Original sequence

Number of helices	40
Average helix length	6.32
Maximum helix length	12
Average helix score	6.85



2.3.2 Optimized sequence

Number of helices	33
Average helix length	5.82
Maximum helix length	9
Average helix score	4.61



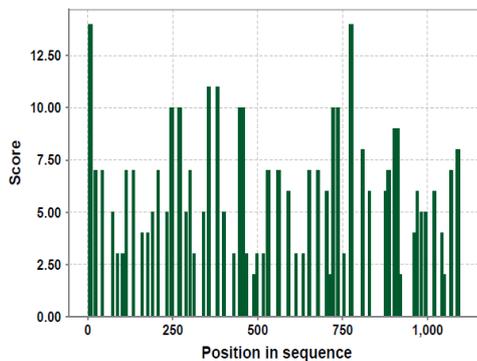
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Objetivando melhorar a eficiência de expressão da proteína completa em *E. coli*, a otimização deste parâmetro objetiva diminuir o número de estruturas secundárias ao nível de RNAm, que potencialmente diminuiriam o nível de expressão, por atrapalharem por exemplo o deslizamento do ribossomo sobre a sequência e o acesso dos anti-códons nos RNAt aos seus respectivos códon. A análise da estrutura de RNAm da sequência original (a esquerda) mostrou a predição de 40 hélices de tamanho médio 6.32. Após a otimização, o número foi reduzido para 33 hélices de tamanho médio de 5.82.

Figura 18 - Otimização de estrutura secundária de RNAm para a sequência DENV NS1 sorotipo 1.

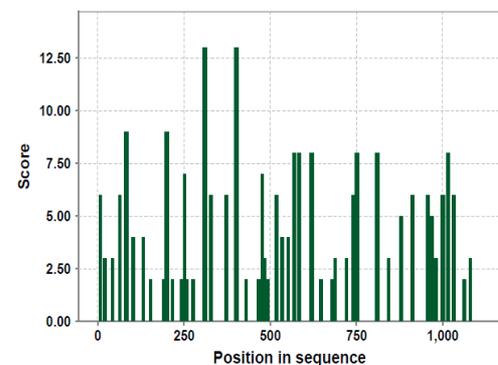
2.3.1 Original sequence

Number of helices	29
Average helix length	6.21
Maximum helix length	9
Average helix score	6.17



2.3.2 Optimized sequence

Number of helices	24
Average helix length	6.00
Maximum helix length	9
Average helix score	5.00



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Objetivando melhorar a eficiência de expressão da proteína completa em *E. coli*, a otimização deste parâmetro objetiva diminuir o número de estruturas secundárias ao nível de RNAm, que potencialmente diminuiriam o nível de expressão, por atrapalharem, por exemplo, o deslizamento do ribossomo sobre a sequência e o acesso dos anti-códons nos RNA transportadores aos seus respectivos códon. A análise da estrutura de RNAm da sequência original (a esquerda) mostrou a predição de 29 hélices de tamanho médio 6.21. Após a otimização, o número foi reduzido para 24 hélices de tamanho médio de 6.00.

A otimização da estrutura secundária de RNAm é importante para tentar reduzir o número e o tamanho de potenciais estruturas conhecidas como *hairpins loops* no RNAm, que podem interferir com o processo de tradução. Um estudo recente de expressão de uma

biblioteca diversificada de genes de proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) em *E. coli* concluiu que o nível de expressão protéico obtido estava limitado primariamente pela dificuldade na iniciação da tradução (KUDLA *et al.*, 2009). A expressão prejudicada foi correlacionada com uma forte estrutura secundária de RNAm perto do local de início da tradução, mas pouca ou nenhuma dependência em relação a *codon usage* ou conteúdo global de GC foi diretamente observada. No entanto, uma vasta literatura científica sugere que, além da estrutura secundária de RNAm, o uso de códons sinônimos próximo da região de iniciação pode impactar os níveis de expressão (WELCH *et al.*, 2009; GUSTAFSSON *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2007), o que poderia ser significativamente melhorado com o uso de cepas de *E. coli* que super-expressam RNAt raros (TITO *et al.*, 1995; KANE, 1995; BURGESS-BROWN *et al.*, 2008).

A otimização da quantidade e distribuição do conteúdo de GC das sequências (exemplificado nas figuras 20 para DENV ENV sorotipo 4 e figura 21 para DENV NS1 sorotipo 4) busca obter uma estrutura mais estável de RNA. Quanto maior for a meia-vida de uma molécula de RNA, mais tempo ela ficará exposta à maquinaria de síntese protéica, favorecendo um aumento do nível de expressão.

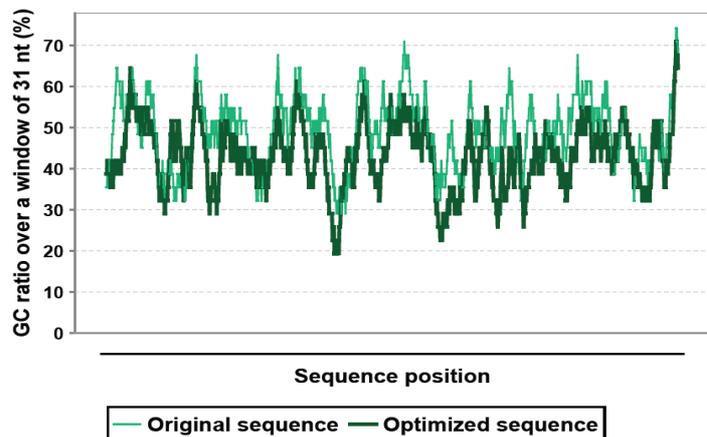
Figura 19 - Otimização gênica para a quantidade e distribuição de GC na sequência de DNA da proteína DENV ENV sorotipo 4.

2.4 GC distribution

GC ratio over a window of 31 nt:

Original sequence: 49.13% (29.03% - 74.19%)

Optimized sequence: 43.43% (19.35% - 70.97%)



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Em verde claro, está representada a sequência original, e em verde escuro a sequência pós-otimização. Os números indicam o conteúdo e distribuição de GC médio utilizando uma janela de 31 nucleotídeos. Utilizando uma janela de 31 nucleotídeos, a sequência original possuía 49,13% de GC, um número reduzido para 43,43% após o processo de otimização.

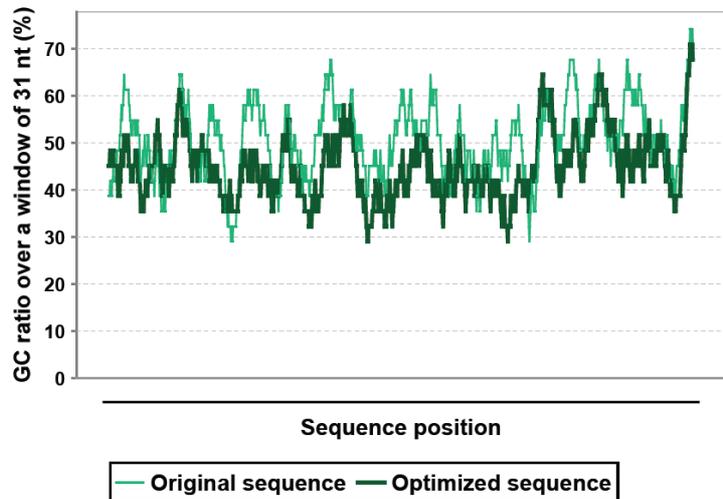
Figura 20. Otimização gênica para a quantidade e distribuição de GC na sequência de DNA da proteína DENV NS1 sorotipo 4.

2.4 GC distribution

GC ratio over a window of 31 nt:

Original sequence: 50.76% (29.03% - 74.19%)

Optimized sequence: 45.37% (29.03% - 70.97%)



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Em verde claro, está representada a sequência original, e em verde escuro a sequência pós-otimização. Os números indicam o conteúdo e distribuição de GC médio utilizando uma janela de 31 nucleotídeos. Utilizando uma janela de 31 nucleotídeos, a sequência original possuía 50,76% de GC, um número reduzido para 45,37% após o processo de otimização.

As sequências foram ainda otimizadas quanto à presença de sítios internos de restrição, sequências repetitivas longas de DNA, presença de ORFs secundárias, entre outros parâmetros já relatados na literatura como determinantes, em maior ou menor grau, para a expressão proteica em sistemas heterólogos. A análise de todos os parâmetros é feita simultaneamente, buscando a sequência que melhor satisfaça todas as condições analisadas. Dessa forma, fica clara a importância da biologia sintética em permitir a manipulação da cinética de tradução dos genes e reestabelecer, ou melhorar, a função de uma variedade de sistemas de expressão.

As otimizações foram realizadas utilizando os mesmos parâmetros para todas as sequências e, como exemplo, a compilação completa de todas as análises realizadas para a proteína DENV NS1 sorotipo 1 encontra-se em anexo neste trabalho (Apêndice A). O algoritmo genético do programa LETO 1.0 foi desenvolvido baseado nos seguintes parâmetros/publicações: *codon usage* (ADANG *et al.*, 1993; BATEMAN; PURTON, 2000; DONG *et al.*, 1996; DURET, 2000; FUHRMANN *et al.*, 1999; GOLDMAN *et al.*, 1995; HAAS *et al.*, 1996; IKEMURA, 1981; KANAYA *et al.*, 1999; KANE, 1995; KIM *et al.*, 1997; KOMAR *et al.*, 1998; KOTSOPOULOU *et al.*, 2000; ROUWENDAL *et al.*, 1997; SLIMKO; LESTER, 2003; VERVOORT *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 1999;); estrutura secundária do RNAm (DALLMANN; DUNN, 1994; LEE *et al.*, 1987; PARKIN *et al.*, 1992); distribuição do conteúdo de GC (AUEWARAKUL, 2005; GALTIER *et al.*, 2001;

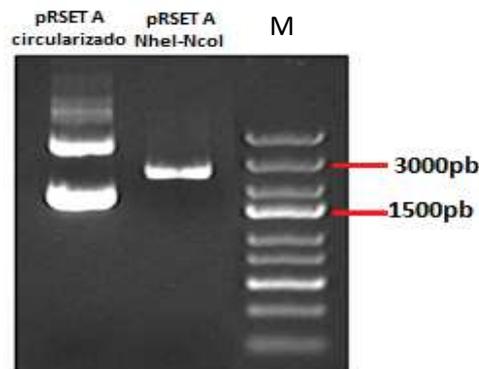
NAVARRE *et al.*, 2006; SEMON *et al.*, 2005; VINOGRADOV, 2005); sequências longas repetitivas e motivos repetitivos de DNA (GURVICH *et al.*, 2005; OXENDER *et al.*, 1979; WEISS, 1991).

6.3 Construção dos vetores de expressão

6.3.1 Preparação do vetor de expressão

Bactérias *E. coli* DH10B quimicamente competentes foram transformadas com o vetor pRSETA vazio, e três clones foram selecionados da placa para a preparação de DNA plasmidial. Os plasmídeos obtidos foram submetidos à clivagem sequencial com as enzimas *Nhe* I e *Nco* I, e migradas em gel 1% agarose. O fragmento vetorial linearizado foi purificado e quantificado por espectrofotometria (figura 22).

Figura 21 - Linearização do vetor pRSETA com as enzimas *Nhe* I e *Nco* I.



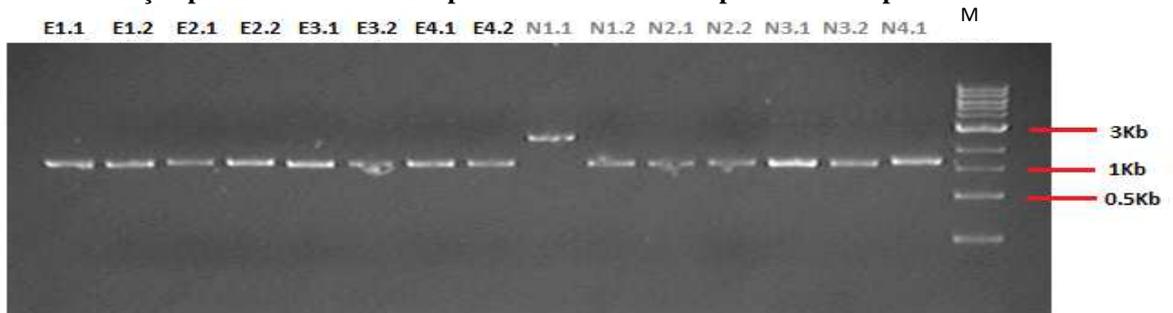
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: O vetor pRSETA, com aproximadamente 2.900 pb foi submetido à clivagem enzimática sequencial com as enzimas *Nhe* I e *Nco* I, visando a sua linearização e preparação para clonagem do gene de interesse. O produto da clivagem foi excisado de gel de 1% agarose, purificado e quantificado por espectrofotometria (4,8 µg/µl). O padrão de peso molecular – M utilizado foi o *GeneRuler Express* (Fermentas).

6.3.2 Preparação dos genes sintéticos para subclonagens no vetor de expressão pRSETA

As sequências otimizadas sintetizadas comercialmente pela GenScript foram recebidas clonadas no vetor comercial pUC57, um vetor comum de clonagem com 2710 pares de bases (pb). Para confirmação da identidade dos genes, os vetores recebidos foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH10B e extrações plasmidiais foram preparadas em média escala (figura 23).

Figura 22 - Extração plasmidial dos vetores pUC57 recebidos da empresa GenScript.

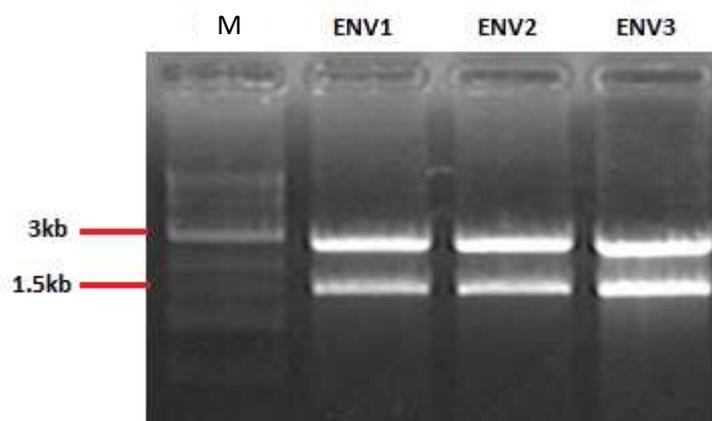


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os vetores apresentam uma migração atípica em gel 1% agarose, apresentando um número relativamente mais baixo de pares de base, devido a conformação super-enrolada (*super-coiled*) do DNA extraído. E - genes ENV, respectivamente organizados por dois clones de cada sorotipo (E1 a E4 representando o gene ENV do sorotipo 1 ao sorotipo 4, respectivamente). N - Genes NS1, respectivamente organizados por dois clones de cada sorotipo (N1 a N4 representando o gene NS1 do sorotipo 1 ao sorotipo 4, respectivamente). O gene NS1 sorotipo 4 possui apenas um clone representado. M - marcador de peso molecular.

Após a extração dos DNA plasmidiais, os genes foram digeridos com as enzimas *Spe I* e *Nco I*, para comprovação da identidade dos mesmos e posterior clonagem no vetor pRSETA. Sítios internos de restrição foram utilizados como uma segunda prova de identificação (dados não mostrados). Com exceção do gene DENV ENV sorotipo 4, todos os vetores digeridos com *Spe I* e *Nco I* liberaram fragmentos com tamanhos esperados, como visualizado nas figuras 24 e 25 através de eletroforese em gel 1% agarose, e os fragmentos foram então purificados.

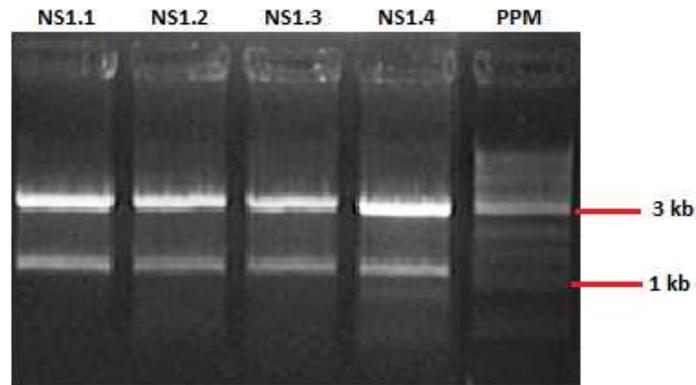
Figura 23 - Clivagem dos genes sintéticos da sequência ENV (sorotipo 1 a 3), a partir do vetor comercial pUC57.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os genes sintéticos foram adequadamente liberados do vetor comercial, através de clivagem enzimática, e purificados a partir de gel 1% agarose. Da esquerda para a direita, temos os fragmentos correspondentes a DENV ENV sorotipo 1 a 3, respectivamente. Nos fragmentos de 2768 pb temos o vetor comercial liberado e nos de 1521 pb, o gene de interesse. O M utilizado foi o padrão de peso molecular 1 Kb *DNA ladder* (*New England Biolabs*).

Figura 24 - Clivagem dos genes sintéticos da sequência NS1 (sorotipo 1 a 4), a partir do vetor comercial pUC57.

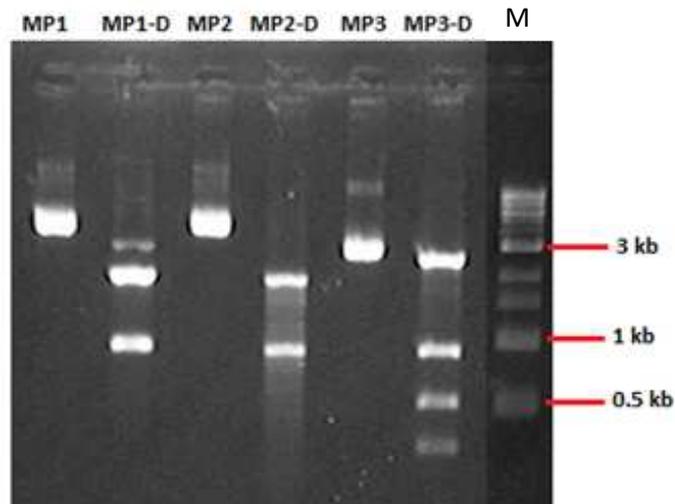


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os genes sintéticos foram adequadamente liberados do vetor comercial, através de clivagem enzimática, e purificados a partir de gel 1% agarose. Da esquerda para a direita, temos os fragmentos correspondentes a DENV NS1 sorotipo 1 a 4, respectivamente. A migração das bandas corresponde ao padrão esperado, com uma banda de 2768 pb representando o vetor comercial liberado, e a banda correspondente ao gene de interesse de 1092 pb. O M utilizado foi o padrão de peso molecular 1 Kb *DNA ladder* (*New England Biolabs*).

A identidade do gene DENV ENV sorotipo 4 não foi confirmada, mesmo após inúmeras provas de clivagem e exaustivo rastreio por clones positivos, como exemplificado na figura 26.

Figura 25 - Extração de DNA plasmidial e provas de clivagem interna para DENV ENV sorotipo 4.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: O DNA extraído (MP, *mini-prep*) dos clones obtidos estão ladeados com as respectivas provas de clivagem com a enzima *Pvu I*. O padrão esperado correspondia a duas bandas, uma de 3396 pb e 896 pb. O padrão esperado não foi encontrado em nenhum dos clones testados. O M utilizado foi o 1 Kb *DNA ladder* (*New England Biolabs*). M - marcador de peso molecular.

O resultado obtido aponta que, possivelmente aconteceu algum erro no processamento da amostra pela empresa fabricante. Esse gene foi excluído das clonagens subsequentes, e proteínas comerciais correspondentes a proteína inteira e a regiões específicas da proteína DENV ENV sorotipo 4 foram adquiridas das empresas MyBiosource e Prospec, para prosseguir os estudos.

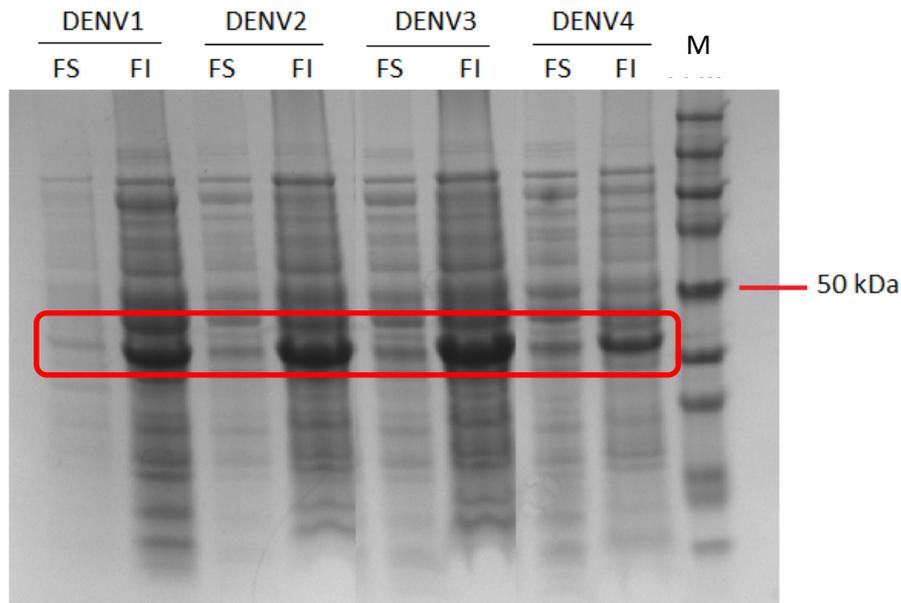
Para todos os demais genes, os fragmentos purificados foram enzimaticamente inseridos em fase de leitura ao vetor de expressão bacteriano pRSETA. As reações de ligação foram utilizadas para transformar bactérias competentes *E. coli* DH10B, e foram preparadas extrações plasmidiais das novas construções. O DNA extraído foi enzimaticamente clivado para conferir a identidade dos genes de interesse, através de migração eletroforética em gel 1% agarose. Todos os clones liberaram fragmentos de tamanho esperado, confirmando o sucesso das estratégias de subclonagem (dados não mostrados).

6.4 Expressão e purificação e renaturação das proteínas recombinantes

6.4.1 Expressão e purificação das proteínas DENV ENV e NS1

Todas as construções foram utilizadas para transformar bactérias *E. coli* BL21 *Star* (Invitrogen), quimicamente competentes. Bactérias contendo os plasmídeos foram submetidas à indução da expressão dos genes heterólogos, fusionados à cauda de His, utilizando o indutor de expressão IPTG. Inicialmente, testes de solubilidade foram realizados para determinar se as proteínas estavam sendo expressas na sua forma solúvel ou em forma de corpúsculos de inclusão. Como visto na figura 27, todas as proteínas NS1 foram expressas na forma de corpúsculos de inclusão, estando presentes na fração insolúvel do extrato protéico como uma banda de aproximadamente 45 kDa, ausente no extrato de células não-induzido.

Figura 26 - Teste de solubilidade das proteínas DENV NS1 após indução com IPTG.



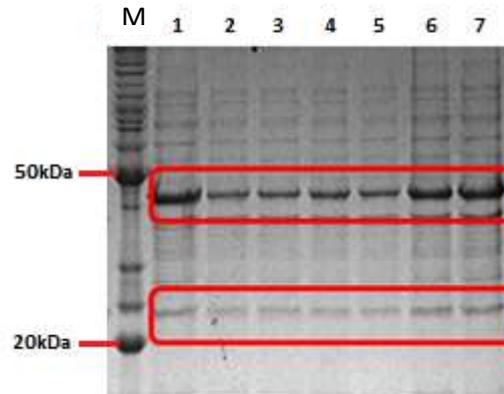
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Após três horas de indução da expressão protéica com o uso de IPTG, as células foram lisadas, e as porções correspondentes a fração solúvel (FS) e a fração insolúvel (FI) foram migradas em gel de poliácridamida, a fim de determinar a solubilidade das proteínas. Todas as proteínas NS1 foram expressas como corpúsculos de inclusão, apresentando-se como uma banda de 45 kDa, não presente na fração solúvel. M - marcador de peso molecular.

A expressão das proteínas DENV NS1 como corpúsculos de inclusão, em células de *E. coli*, já tinha sido previamente relatada por outros estudos (ALLONSO *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2001).

Para todas as construções, diferentes clones foram triados através do fracionamento do extrato total de bactérias após indução com IPTG, em gel 12.5% poliácridamida a fim de selecionar os clones com melhores níveis de expressão, como exemplificado na figura 28 para DENV NS1 sorotipo 3.

Figura 27 - Indução da expressão da proteína DENV NS1 sorotipo 3 em pequena escala para selecionar clones com melhores níveis de expressão.

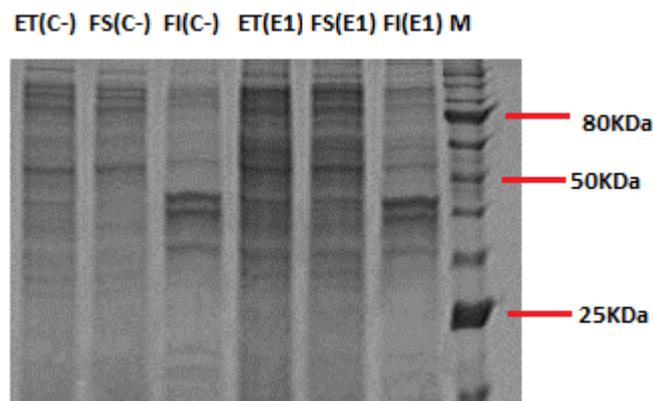


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Para triagem de clones com maior nível de expressão, sete clones (representados de 1 a 7) da proteína DENV NS1 sorotipo 3 foram testados. A proteína NS1 expressa apresenta em torno de 45 kDa, e apresenta outras isoformas de migração variável de menor peso molecular (a principal apresentando em torno de 32 kDa), como previamente relatado por Amorim *et al.*, 2011. O clone sete foi escolhido. A quantidade de proteína total por poço foi normalizada, para permitir comparação visual das bandas.

Neste trabalho, não foi obtida expressão das proteínas ENV completas de nenhum sorotipo, como exemplificado para a proteína DENV ENV sorotipo 1, na figura 29, mesmo sob diferentes condições de expressão testadas e rastreamento de diversos clones. A proteína teria peso molecular predito de aproximadamente 56 kDa. Comparativamente ao controle negativo (células não induzidas, C-), não foi observada nenhuma banda em destaque no clone testado (DENV ENV sorotipo 1, E1), seja no extrato protéico total (ET), na fração solúvel (FS) ou insolúvel (FI).

Figura 28 - Ensaio de expressão em pequena escala para proteína DENV ENV sorotipo 1.

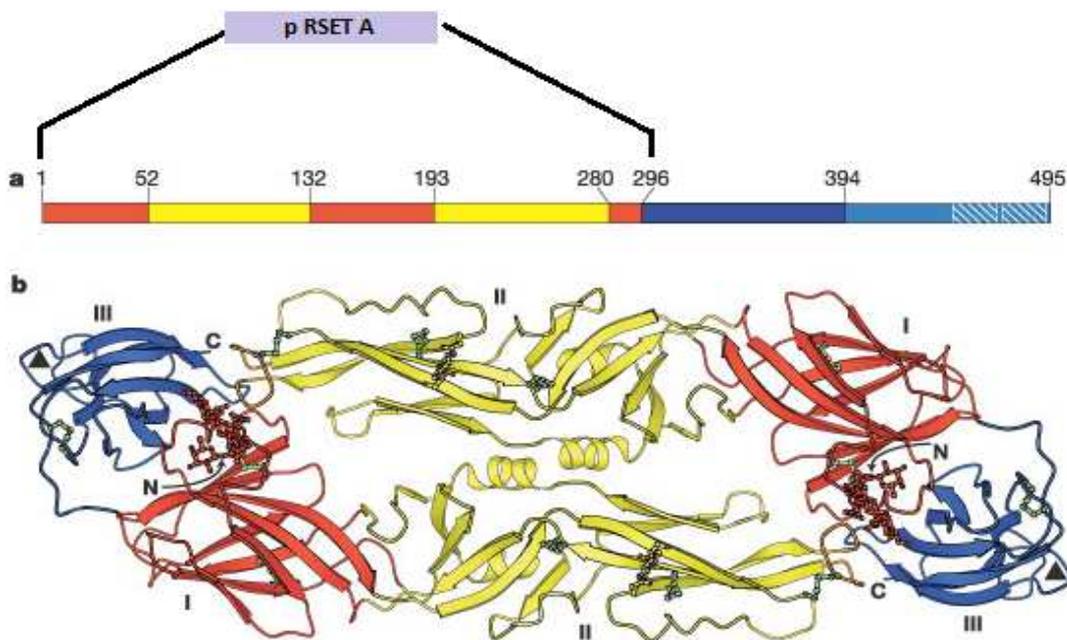


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A proteína esperada possui peso molecular predito de aproximadamente 56 kDa. Não é notado nenhum nível de expressão da proteína recombinante (E1), presente em qualquer das partes do extrato celular de *E. coli*. As frações obtidas a partir de células não induzidas são utilizadas como controle negativo (C-). ET - extrato total. FS - fração solúvel e FI - fração insolúvel. M - padrão de peso molecular.

Trabalhos anteriores relatam a dificuldade de expressar a proteína ENV em sua forma completa em sistema procarioto. Tan *et al.* (2007) realizaram a expressão da forma inteira e formas truncadas da glicoproteína recombinante ENV de Dengue vírus sorotipo 1, Singapura cepa S275/90, em células de levedura *Pichia pastoris* usando um vetor de secreção. Outras estratégias abordam a expressão da proteína fusionada, por exemplo, com o antígeno de superfície da hepatite B (BISHT *et al.*, 2001) e com glutathiona S-transferase (SUGRUE *et al.*, 1997). Cohen *et al.* (1990) ao trabalhar com um clone que expressava 93% do gene da proteína viral, relataram que a expressão da construção se mostrou prejudicial ao hospedeiro bacteriano. No mesmo trabalho, outro clone que continha apenas 76% do gene ENV mostrou-se bastante estável *in vitro*, bem como *in vivo*. Diante desse fato, uma nova estratégia foi testada: os genes comerciais foram novamente digeridos visando separar os domínios protéicos de ENV, e subclonar a porção correspondente aos domínios I e II (como visto na figura 30), contendo inúmeros epítomos de interesse, altamente imunogênicos para humanos.

Figura 29 - Esquema representativo da sequência da proteína ENV de dengue vírus representada por seus domínios funcionais.



Fonte: Adaptado de Modis *et al.*, 2004.

Nota: Em a: Estrutura linear da sequência aminoacídica da proteína ENV. Em vermelho, está representado o domínio I, em amarelo o domínio II e em azul o domínio III. Em b: Conformação da proteína ENV no vírus maduro, em estado dimerizado, em solução e em pH acima do requerido para as mudanças conformacionais necessárias para a fusão com a célula hospedeira, mostrando a disposição dos domínios funcionais na proteína nativa, exposta ao sistema imunológico.

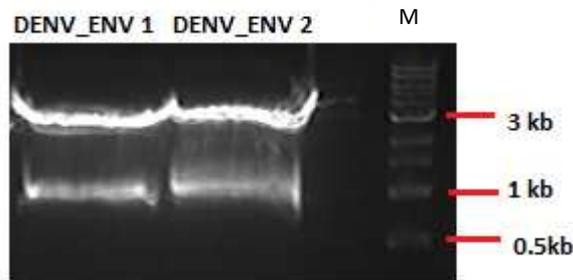
A estratégia abordada envolveu a clonagem do segmento gênico que, na proteína funcional do vírus maduro, corresponde aos domínios I e II. Essa estratégia foi prontamente

aplicada para DENV ENV sorotipos 1 e 2 utilizando enzimas de restrição para separar os domínios de interesse.

Para DENV ENV sorotipo 1, as enzimas *Spe* I e *Kpn* I foram utilizadas para liberar o segmento de DNA do gene completo, e foi obtido um fragmento de 918 pb, contendo a sequência gênica dos domínios I e II. O vetor pRSETA foi digerido com as enzimas *Nhe* I (compatível com *Spe* I) e *Kpn* I, possibilitando a formação de extremidades coesivas complementares.

Para DENV ENV sorotipo 2, utilizando as enzimas *Spe* I e *Mfe* I, foi obtido um segmento de 906 pb correspondente à sequência gênica dos domínios I e II da proteína ENV. O vetor pRSETA foi digerido com as enzimas *Nhe* I (compatível com *Spe* I) e *Eco* RI (compatível com *Mfe* I), também tornando a clonagem simples por meio da posterior ligação enzimática com a enzima T4 DNA ligase. Os fragmentos obtidos a partir da clivagem dos genes comerciais clonados em pUC57 podem ser visualizados na figura 31.

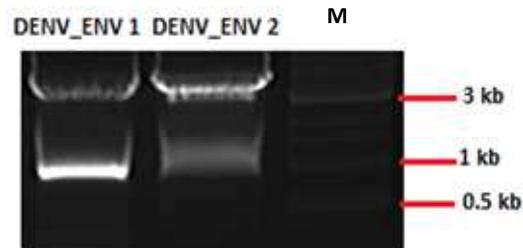
Figura 30 - Clivagem enzimática dos plasmídeos comerciais DENV ENV sorotipo 1 e 2.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: O fragmento digerido pelas enzimas *Spe*I e *Kpn*I para DENV ENV sorotipo I possui 918 pb, e o DENV ENV sorotipo 2, após clivagem enzimática com *Spe*I e *Mfe*I, liberou um fragmento de 906 pb. O M utilizado foi o 1kb DNA ladder (*New England Biolabs*).

Após a purificação dos fragmentos, foi realizada a clonagem em vetor pRSETA. A confirmação da clonagem foi feita através de provas de clivagem externa, liberando os fragmentos gênicos correspondentes aos domínios I e II de ENV, com aproximadamente 900 pb, e o vetor pRSETA com aproximadamente 3500 pb, conforme dados apresentados na figura 32.



: pRSETA.

agmentos correspondentes
esentando como esperado
do, contendo em torno de

Para a clonagem de DENV ENV sorotipo 3 não foi encontrado nenhum sítio enzimático na região desejada entre a sequência dos domínios I e II e o domínio III, então *primers* foram desenhados (quadro 2) para amplificar o segmento de interesse através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) e acrescentar adaptadores nas extremidades da sequência, contendo sítios para a enzima *Spe* I a montante do gene e para a enzima *Kpn* I a jusante do mesmo, possibilitando a clonagem no vetor pRSETA utilizando o sistema de clonagem por clivagem e ligação enzimática.

gene DENV ENV 3.

Primer_Senso: ENV_3_DI-II

5' GACATATGACTAGTATGAGGTGCGTCGGTG 3'
(SpeI) (Met)

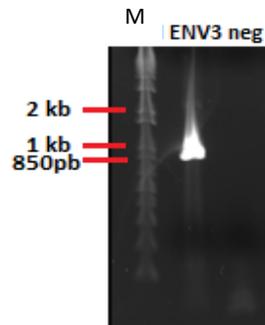
Primer_Anti-senso: ENV_3_DI-II

5' ACCGGGTACCTCACCCCTTAAGTTCCAACCTTGTCATTTCAGTC 3'
(KpnI) (Stop)

e restrição (em vermelho) a
osterior clonagem em vetor

Utilizando os *primers* descritos, o segmento gênico contendo 894 pb foi devidamente amplificado, conforme mostrado na figura 33.

Figura 32 - Amplificação da sequência gênica do domínio I e II do gene DENV ENV sorotipo 3, através de PCR.



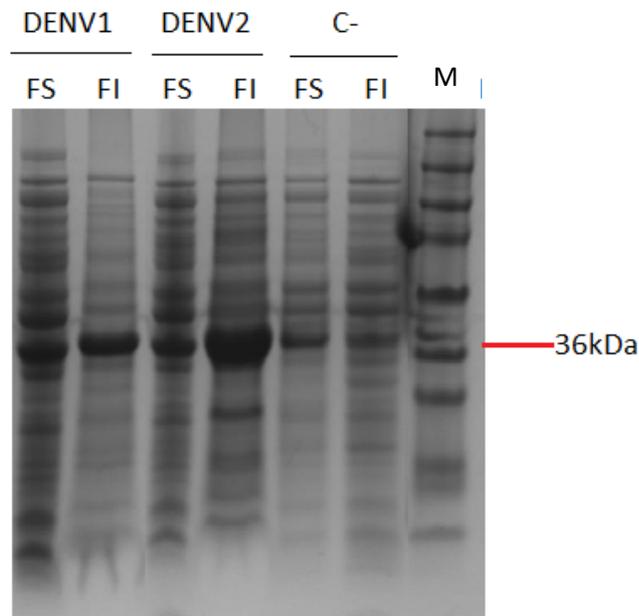
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Utilizando os primers descritos na figura 33, a amplificação de um segmento de 894 pb foi obtida. Em neg, está representado o controle negativo da reação de PCR e o marcador de peso molecular (M) utilizado foi o E-Gel 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Após a clivagem do fragmento amplificado com *Spe* I e *Kpn* I, sucessivas tentativas de subclonagem foram realizadas no vetor pRSETA previamente clivado com as enzimas *Nhe* I e *Kpn* I, porém nenhum clone foi obtido. Dessa forma, também para DENV ENV sorotipo 3 foram adquiridas proteínas comerciais para continuação das análises.

Para DENV ENV (domínio I/II) sorotipos 1 e 2 foram realizados ensaios pilotos de expressão para definição dos clones com maior nível de produção de proteína (dados não mostrados) e testes de solubilidade (figura 34), conforme previamente realizado para as proteínas NS1, que mostraram que também as proteínas DENV ENV (domínio I/II) sorotipos 1 e 2 foram expressas como corpúsculos de inclusão, em células *E. coli*.

Figura 33 - Teste de solubilidade das proteínas DENV ENV truncadas sorotipo 1 e 2, após indução com IPTG.

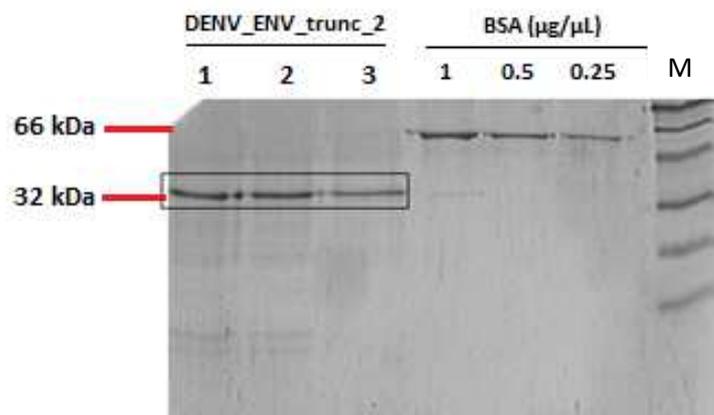


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Após 3 horas de indução da expressão protéica com o uso de IPTG, as células foram lisadas e as porções correspondentes à fração solúvel (FS) e à fração insolúvel (FI) foram migradas em gel de poliacrilamida a fim de determinar a solubilidade das proteínas. As proteínas DENV ENV (domínio I/II) sorotipos 1 e 2 foram expressas como corpúsculos de inclusão, apresentando-se como uma banda em torno de 32 kDa não presente na fração solúvel. M - marcador de peso molecular.

Para ilustrar a expressão das proteínas DENV ENV (domínio I/II), a figura 35 mostra a proteína DENV ENV (domínio I/II) sorotipo 2 após purificação, apresentando em torno de 32 kDa, corroborando a predição realizada *in silico*.

Figura 34 - Quantificação da proteína Envelope (domínios I/II), do vírus DENV sorotipo 2.

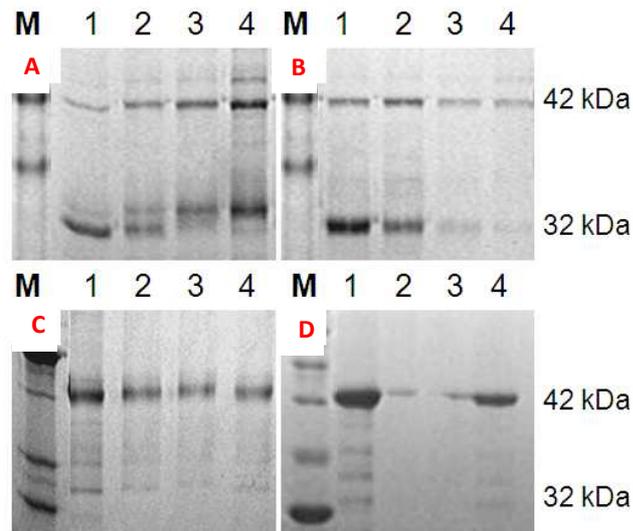


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A proteína DENV ENV (domínio I/II) sorotipo 2 (representada em DENV_ENV_trunc_2, em diluição seriada de 1 a 3) tem peso molecular aproximado de 32 kDa. A figura também apresenta a curva de diluição da proteína padrão (BSA, com 66 kDa). M - *Protein Ladder* (Invitrogen).

Conforme relatado por estudos anteriores (AMORIM *et al.*, 2010), as proteínas NS1 apresentam duas formas principais quando submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, uma com aproximadamente 45 kDa e outra com 32 kDa, conforme pode ser visualizado nos géis de purificação retratados na figura 36.

Figura 35 - Proteínas DENV NS1 (sorotipo 1 a 4) após purificação em resina de níquel ativada.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Em ordem, DENV NS1 sorotipo 1 a 4 estão respectivamente representadas na figura de A para D. Em 1, 2 e 3, temos as proteínas eluídas em condições de desnaturação, por 30 minutos cada, sucessivamente (eluato 1, eluato 2 e eluato 3). Em 4, encontra-se a fração proteica ainda ligada a resina após as três eluições prévias. M. Protein ladder (*New England Biolabs*).

O rendimento protéico obtido com a expressão das proteínas está representado na tabela 1, e foi considerado bem variável entre as proteínas expressas. O menor valor obtido foi de 6.92 mg por litro de cultura, para a proteína DENV ENV (domínio I/II) sorotipo 1. Por sua vez, a proteína DENV NS1 sorotipo 3 alcançou aproximadamente 17 mg por litro, considerado um nível de expressão bastante elevado.

Tabela 1 - Quantificação da concentração das proteínas recombinantes DENV ENV e NS1, e do rendimento protéico total das expressões em *E. coli* BL21 Star.

Proteína	Rendimento por litro de cultura (mg/l)
DENV1 ENV(domínio I/II)	6.92
DENV2 ENV (domínio I/II)	10.7
DENV1 NS1	16,30
DENV2 NS1	16.71
DENV3 NS1	13.96
DENV4 NS1	7.3

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: O rendimento da expressão das proteínas recombinantes está representando pela quantidade de proteína obtida (em mg) por litro de cultura bacteriana.

Os valores de recuperação da proteína NS1 por purificação em resina de níquel em nosso trabalho é comparável a relatos na literatura de super-indução da proteína NS1 em sistema bacteriano. Huang e outros (2001) relataram um rendimento variando entre 10-30 mg/l em bactérias expressando as proteínas NS1 completas ou apenas a metade C-terminal.

No caso da proteína ENV, os valores obtidos foram relativamente menores quando comparados aos achados na literatura. Batra *et al.* (2010) expressaram o domínio III da proteína ENV de DENV2 com um rendimento final maior que 50 mg/l, mesmo valor recuperado por Tripathi *et al.* (2011) com a expressão do domínio III da proteína ENV de DENV3, ambos trabalhando com sistema procarioto. Wei *et al.* (2002) obtiveram altos níveis de expressão (100 mg/l) da proteína completa ENV sorotipo 2 em sistema eucarioto usando *P. pastoris* como hospedeiro.

6.4.2 Renaturação das proteínas recombinantes DENV NS1

O fato das proteínas NS1 completas serem expressas como corpúsculos de inclusão tem um impacto crucial na sua utilização para o diagnóstico de dengue. Devido às perdas de modificações pós-traducionais decorrentes da utilização do sistema bacteriano, as estruturas secundária e terciária da proteína sofrem modificações, o que afeta a formação de dímeros e diminui a imunogenicidade e antigenicidade da proteína, com consequente perda de função e de determinantes antigênicos da proteína nativa (AMORIM *et al.*, 2010).

Consequentemente, após o processo de desnaturação utilizando o agente caotrópico de escolha (uréia, em nosso caso) para obter a solubilização da proteína a partir dos corpúsculos de inclusão, é necessário submeter a proteína a algum processo de renaturação para encontrar o estado conformacional mais adequado, mediante a retirada do agente desnaturante. Existem muitas maneiras de realizar isso, sendo as mais comuns a diluição e a diálise (ALLONSO *et al.*, 2011).

Nós optamos por submeter a proteína a um método de diálise lenta, com um tampão contendo vários agentes que comprovadamente interferem no dobramento protéico. Um fator limitante deste método é a necessidade da utilização de uma baixa concentração de proteína, para evitar a precipitação e formação de agregados não solúveis. Nós utilizamos a concentração de 100 µg/ml, e obtivemos a recuperação de proteína solúvel para os quatro sorotipos, com uma recuperação total variando de 80% para DENV NS1 sorotipo 4 até 98% para DENV NS1 sorotipo 2 completa. A tabela 2 mostra o rendimento protéico obtido com o método de renaturação NS1-rec, e faz comparação com o método de referência padronizado por Allonso *et al.* (2011), NS1-ASB.

Tabela 2 - Quantificação das proteínas recombinantes DENV NS1-rec e NS1-ASB após o processo de renaturação e cálculo do rendimento protéico total dos diferentes métodos.

Proteína	NS1-rec	NS1-rec	Rendimento	NS1-ASB	NS1ASB	Rendimento
NS1	[] inicial	[] final		[] inicial	[] final	
DENV1	200 µg	180 µg	90%	200 µg	156 µg	78%
DENV2	200 µg	196 µg	98%	200 µg	160 µg	80%
DENV3	200 µg	172 µg	86%	200 µg	164 µg	82%
DENV4	200 µg	160 µg	80%	200 µg	92 µg	46%

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: As concentrações inicial e final do processo de renaturação estão listadas para ambas as metodologias aplicadas, juntamente com o rendimento percentual obtido.

O rendimento obtido para as proteínas NS1-ASB foi comparável ao obtido por Allonso e outros em 2011 (82%), utilizando a mesma metodologia para DENV NS1 sorotipo 2. O método de renaturação desenvolvido por nosso grupo, no entanto, apresentou um rendimento superior ou equivalente para todas as proteínas NS1, dos quatro sorotipos virais.

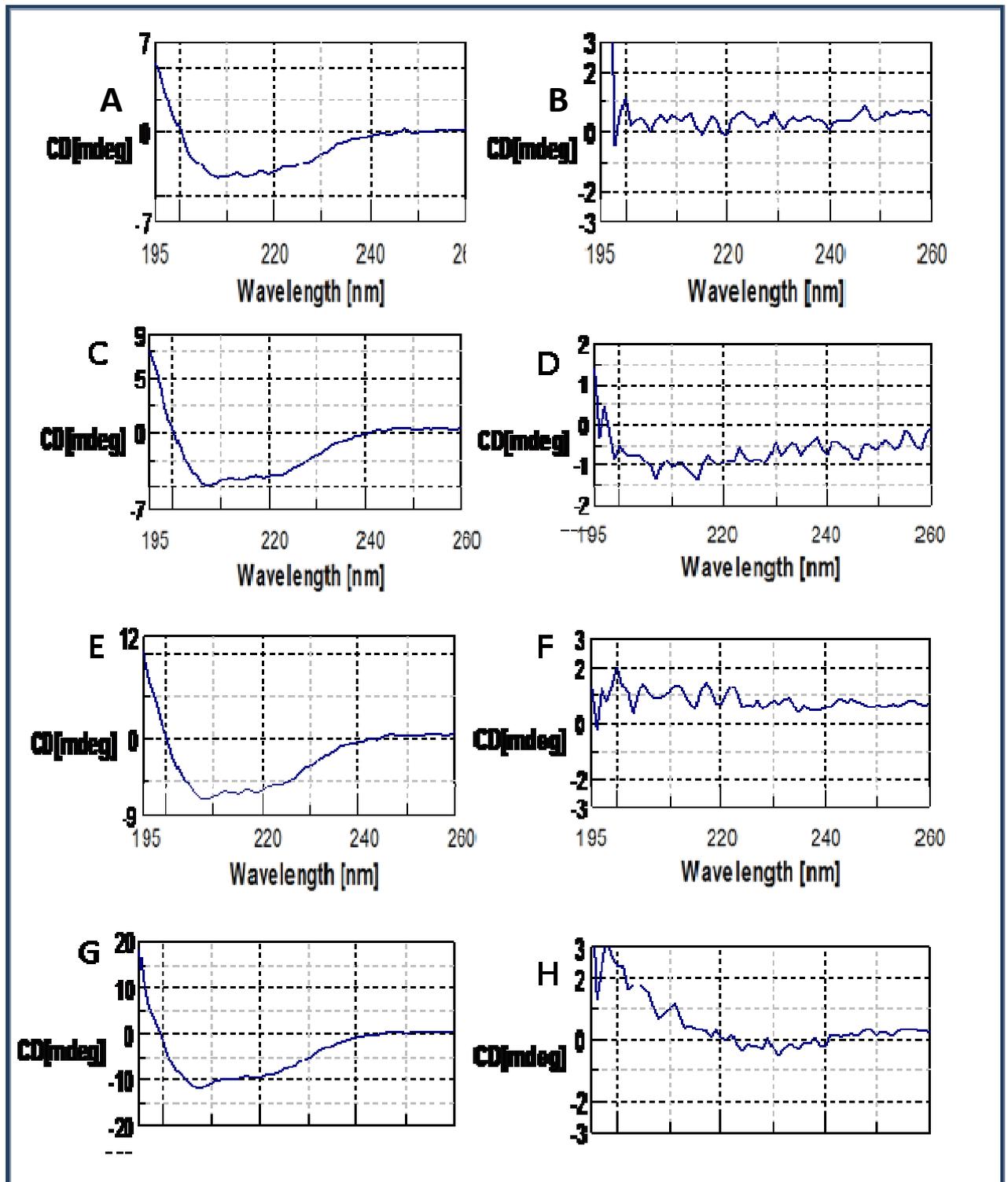
6.5 Análise de Dicroísmo Circular (CD) das proteínas NS1 pós-renaturação

As proteínas NS1 foram submetidas a análise no espectropolarímetro para análise de CD com base na UV de comprimento de onda distante, para confirmação da eficiência da metodologia de renaturação e análise da estrutura secundária.

A figura 37 mostra os espectros obtidos para as proteínas NS1-ASB e proteínas desnaturadas com 8 M de uréia, e pode-se claramente notar a diferença entre os mesmos. As proteínas renaturadas apresentam a formação de dois picos negativos principais, um de maior intensidade, a 208 nm, e outro menor em torno de 220 nm, indicando a mistura de componentes de estrutura secundária (α -hélices e β -folhas), como já havia sido previamente relatado por Amorim *et al.* (2010) e Allonso *et al.* (2011). Este último, utilizando o algoritmo de decomposição do programa CDSSTR para a proteína DENV NS1 sorotipo 2 obteve valores de 27% de α -hélices, 43% folhas-beta e 30% de estruturas aleatórias e *loops*.

As proteínas NS1 sorotipos 4, 3 e 2 apresentaram os melhores espectros, com maior definição dos picos negativos esperados, respectivamente. A proteína NS1-ASB sorotipo 1 apresenta os mesmos picos, mas a amplitude do sinal alcançada não se igualou as demais proteínas. Todas as proteínas contendo uréia apresentaram apenas estruturas aleatórias no espectro lido.

Todos os espectros foram corrigidos pela linha de base do tampão utilizado para diluição das amostras (0.1x PBS). A análise de DC das proteínas NS1-rec não foi possível de ser realizada pois o tampão onde as proteínas foram dialisadas continha moléculas espectralmente interferentes, capazes por si só de realizar desvios na luz polarizada incidente. As tentativas de troca de tampão (para 0.1x PBS, pH 7.4, utilizando métodos de diálise) provocaram grandes perdas na quantidade de proteína, através de formação de agregados e precipitação.



), F e H amostras desnaturadas

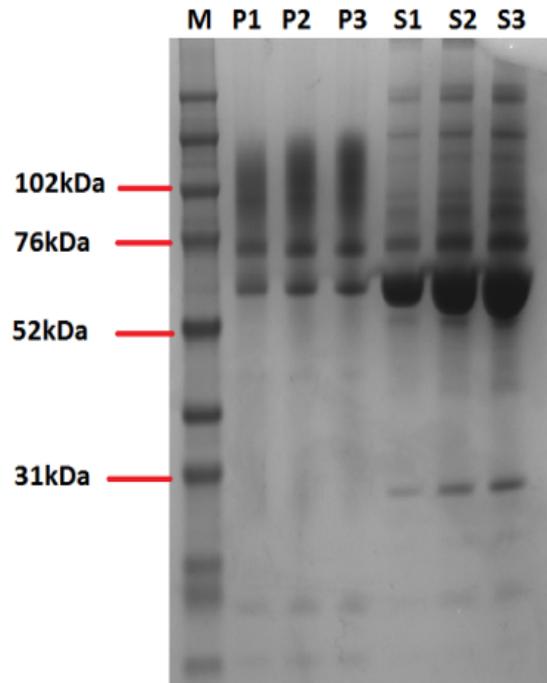
6.6 Produção e purificação de anticorpos anti-dengue NS1 policlonais tetravalentes

As quatro proteínas DENV NS1-rec foram utilizadas simultaneamente para imunizar coelhos saudáveis num protocolo que seguiu quatro pulsos de imunização, com intervalos de 15 dias entre cada pulso. Foram inoculadas 100 µg/pulso de proteína total, sendo 25 µg de proteína sorotipo-específica. Após o quarto pulso, os coelhos foram sacrificados e os soros policlonais foram obtidos por punção cardíaca. Os anticorpos produzidos contra a proteína NS1-rec podem ser considerados tetravalentes, sendo capazes de reconhecer as proteínas dos quatro sorotipos virais. Um outro aspecto importante a ser abordado foi a necessidade de preservar a estrutura conformacional da proteína em busca de eficiência na imunogenicidade dos antígenos, como já previamente relatado por Allonso *et al.* (2011) e Amorim *et al.* (2010). Para tanto, a imunização foi realizada com a proteína solúvel, não-desnaturada, na forma dimerizada, diluída em solução 1x PBS. Para purificar tais anticorpos, é importante utilizar um método também não-desnaturante, que preserve em solução os anticorpos gerados (especialmente aqueles contra os epítomos conformacionais). O método de escolha nesse trabalho foi o kit de purificação Thermo Scientific Melon Gel IgG (Thermo Scientific), que compreende uma alternativa simples para o tradicional método de purificação utilizando proteína A ou proteína G, que eficientemente purifica anticorpos a partir de amostras humanas, de coelho, camundongo, entre outras. A resina de purificação liga-se e remove as outras proteínas séricas, permitindo que as imunoglobulinas puras sejam coletadas, gerando para a grande maioria das amostras uma recuperação de 90%, com uma pureza maior que 80% (Thermo Scientific, 2011), resultando em preparações de alta pureza e alta atividade. Esse método é considerado mais efetivo que o uso de proteína A/G para purificação de IgG de humano, coelho e cabra.

A figura 38 mostra o resultado da purificação do anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente utilizando o kit Thermo Scientific Melon Gel, mostrando o alto grau de pureza da amostra. A partir de 500 µl de soro inicial (numa concentração de 42.07 µg/µl, totalizando aproximadamente 21 mg de proteína total), foram obtidos cinco ml de anticorpo purificado na concentração de 0.64 µg/µl, resultando em aproximadamente 3.2 mg de anticorpo purificado (aproximadamente 15,23% da quantidade de proteína total inicial da amostra). Na figura, é possível notar claramente a presença da cadeia pesada de IgG na fração purificada, e a perda de intensidade na cadeia leve em amostras diluídas, evento comum quando é realizada a purificação de Ig de coelho.

Os anticorpos purificados e quantificados foram utilizados em diferentes técnicas para testar sua sensibilidade, especificidade e possíveis aplicações, como será mostrado nas sessões posteriores deste trabalho.

Figura 38 - Purificação do anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: O soro de coelho após imunização (diluído 1:200, 1:100 e 1:50 em S1, S2 e S3, respectivamente) foi purificado utilizando o kit Thermo Scientific Melon Gel, gerando uma fração pura de anticorpo purificado, que foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (diluído de 1:10, 1:6 e 1:3 em P1, P2 e P3, respectivamente).

6.6 Avaliação da sensibilidade e especificidade dos anticorpos específicos contra as proteínas DENV NS1

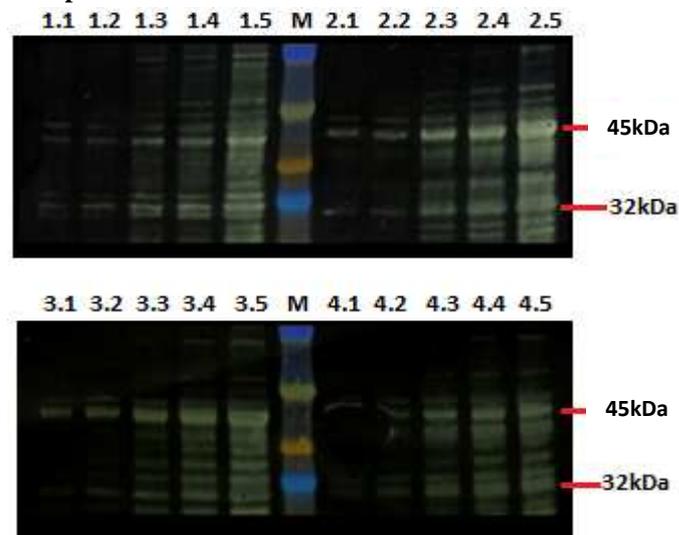
Diferentes metodologias foram testadas a fim de avaliar a capacidade do anticorpo produzido de reconhecer a proteína DENV NS1 recombinante e/ou NS1 selvagem produzida em infecções naturais, e assim estabelecer as técnicas em que o anticorpo anti-dengue NS1 tetravalente pode ser aplicado.

6.6.1 Western blot

Os anticorpos anti-dengue NS1 tetravalente devidamente purificados foram avaliados quanto a capacidade de reconhecer as proteínas recombinantes que lhes deram origem através

de ensaios de *Western blot*. Nestes ensaios, os anticorpos produzidos contra as proteínas DENV NS1 foram capazes de fortemente reconhecer as proteínas recombinantes desnaturadas (Figura 39) em concentrações de até $0.625 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, e mais importante que isso, de reconhecer as proteínas DENV NS1 após renaturação (figuras 40 e 41), com destaque para a detecção das formas diméricas da proteína, obtidas através das técnicas de renaturação aplicadas. Esses resultados mostram a eficácia da metodologia abordada para a geração de proteínas, conformacionalmente adequadas, para a utilização em ensaios sorológicos.

Figura 37 - Western blot das proteínas DENV NS1 desnaturadas.

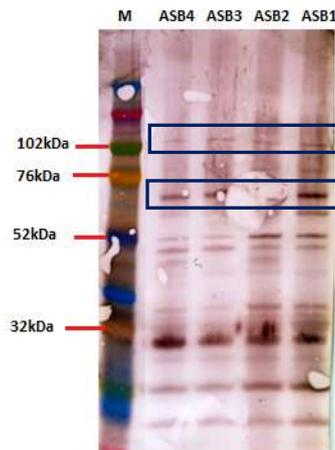


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A curva de diluição das amostras de proteína de cada sorotipo iniciam com $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ na diluição 5, seguido de 0.5, 0.25, 0.125 e $0.0625 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ na diluição 1. Os números iniciais representam o sorotipo da proteína em questão (1 a 4). O anticorpo anti-dengue NS1 tetravalente reconhece as quatro proteínas que lhe deram origem até em concentrações consideradas muito baixas. O anticorpo liga ainda as diferentes isoformas de NS1 que se apresentam quando esta proteína é submetida a análise eletroforética.

Após a diálise, tanto as proteínas DENV NS1-ASB quanto DENV NS1-rec foram concentradas e submetidas à migração eletroforética.

Figura 38 - Western blot das proteínas DENV NS1-ASB após renaturação.

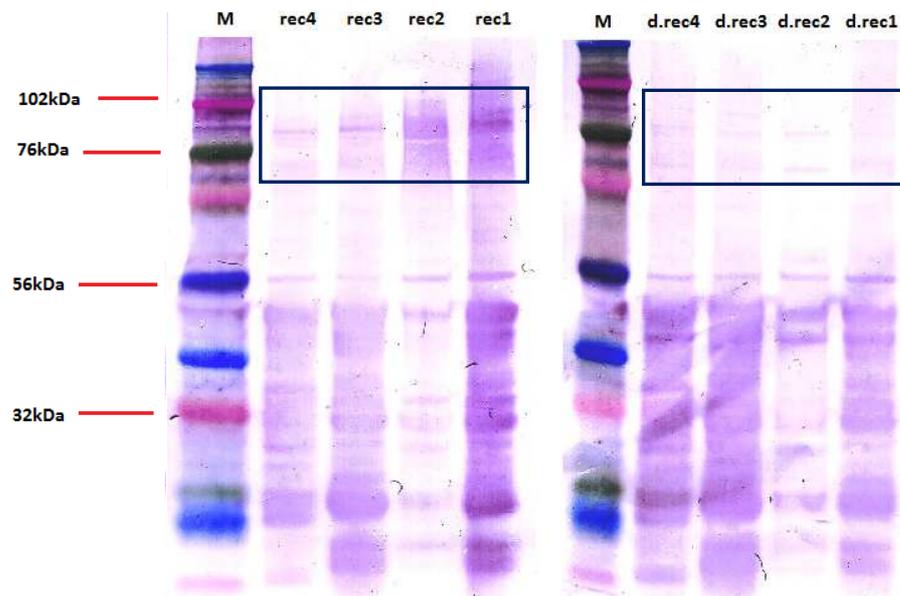


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Além das bandas monoméricas da proteína DENV NS1 (48 kDa e 32 kDa, aproximadamente), as bandas correspondentes às formas diméricas da proteína, com aproximadamente 64 kDa e 100 kDa estão presentes no gel, mostrando o sucesso da estratégia de renaturação das quatro proteínas NS1 de dengue vírus. ASB1 a 4, correspondem, respectivamente, a DENV NS1 sorotipo 1 a 4; M-marcador de peso molecular. A revelação das bandas se deu através do método colorimétrico Immuno-Blot Opti-4CN (BioRad).

Para as proteínas NS1-ASB, foi possível visualizar a formação de duas bandas de alto peso molecular (aproximadamente 64 kDa e 100 kDa) após o processo de diálise, que corresponderiam às formas diméricas da proteína NS1, após renaturação. Para as proteínas NS1-rec, apenas a banda de mais alto peso molecular foi passível de visualização, apresentando em torno de 100 kDa. Essa banda, após denaturação térmica da amostra a 100 °C por dez minutos, praticamente desaparece, mostrando a dependência da conformação protéica de NS1 para o evento da dimerização (figura 41).

Figura 39 - Western blot das proteínas DENV NS1-rec após renaturação.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Além das bandas monoméricas da proteína DENV NS1 (45 kDa e 32 kDa, aproximadamente) pelo menos uma banda de alto peso molecular pode ser visualizada no gel de poliaramida, com aproximadamente 100 kDa, que corresponderia a formação de dímeros pela proteína NS1 após o processo de renaturação. Isso se torna ainda mais destacado quando as amostras são submetidas a nova desnaturação através de calor (100 °C, durante 10 minutos), e a visualização das bandas de alto peso molecular é praticamente extinta para as quatro proteínas NS1 de dengue vírus. d.NS1 corresponde as amostras desnaturadas por calor, de cada sorotipo (1 a 4) e rec 1 a 4 correspondem as amostras após renaturação e concentração das proteínas. ASB1 a 4, correspondem, respectivamente, a DENV NS1 sorotipo 1 a 4; M - marcador de peso molecular.

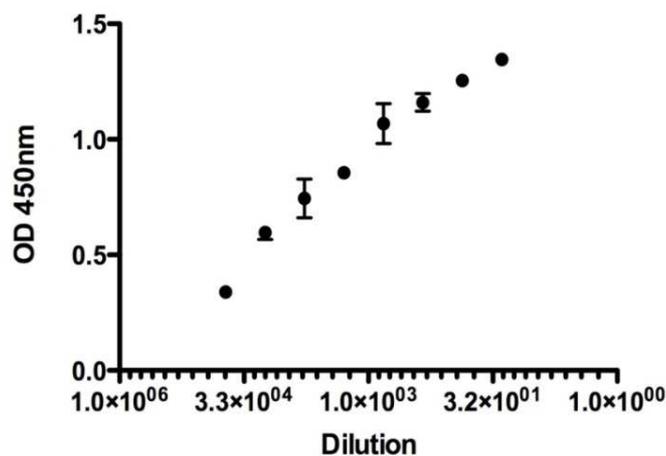
6.6.2 Ensaio ELISA de captura para a proteína DENV NS1

A importância dos testes de captura para a proteína NS1 é largamente reconhecida na literatura (BESSOFF *et al.*, 2008; BESSOFF *et al.*, 2010; SHU *et al.*, 2004; QUEIROZ LIMA, 2011) como uma ferramenta para diagnóstico precoce para DENV, essencial em condições de epidemia e ainda mais valorizada pela necessidade de um diagnóstico cada vez mais precoce e facilmente aplicável na rede pública de saúde, para reconhecimento de casos e correto manejo de pacientes.

Para testar a aplicação do anticorpo policlonal anti-dengue NS1 policlonal tetravalente em ensaios de ELISA de captura, primeiramente estabelecemos a concentração mais adequada para uso do anticorpo, produzido em coelho, para detecção das proteínas NS1, em ensaios de ELISA. Cinquenta µl de uma solução contendo dois e meio µg/ml de cada proteína NS1 por sorotipo viral (portanto, uma concentração final de 10 µg/ml de proteína total, contendo uma mistura das quatro proteínas NS1 de dengue) foi utilizada para sensibilizar a placa, durante 18 horas. O anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente purificado, numa

concentração de $0.64 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, foi utilizado como anticorpo de detecção para a proteína NS1 de dengue num ELISA direto, através de uma curva de titulação do anticorpo. O ponto inicial da curva foi a diluição de 1:25, e oito diluições na ordem de três foram sucessivamente realizadas. De acordo com a curva obtida (figura 42), a concentração de 1:500 (em torno do ponto obtido na quarta diluição) foi escolhido para a diluição do anticorpo anti-dengue NS1 policlonal em ensaios de ELISA.

Figura 40 - Curva de titulação do anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente produzido em coelho usado como anticorpo de detecção para a proteína DENV NS1.



Fonte: Elaborado pela autora.

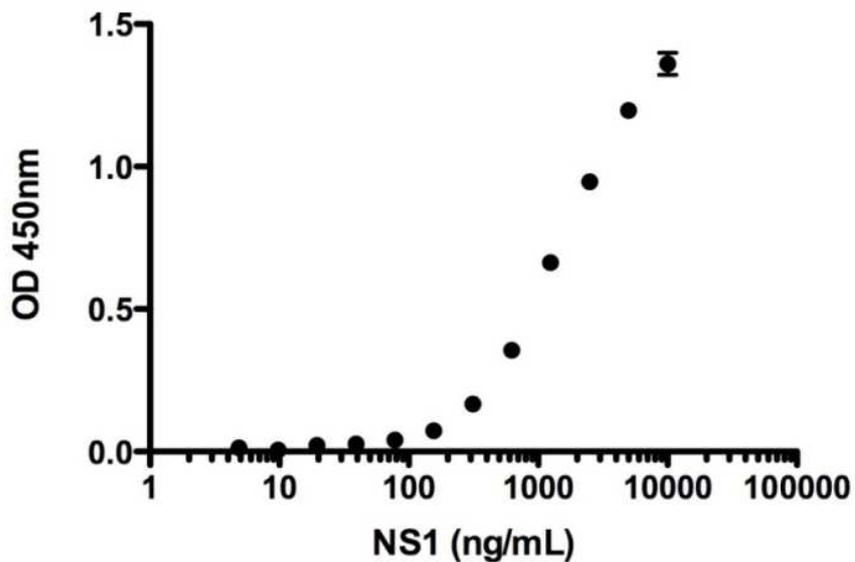
Nota: A concentração final de $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína total (uma mistura das quatro proteínas NS1 de dengue) foi utilizada para sensibilizar a placa, e oito diluições do anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente foram realizadas. A concentração de 1:500 foi estabelecida para ensaios posteriores.

Para realização do ELISA de captura para DENV NS1 um segundo anticorpo anti-dengue NS1, produzido em um diferente hospedeiro, foi selecionado. Depois de diferentes tentativas com alguns anticorpos comercialmente, o anticorpo monoclonal [DN3] para a glicoproteína NS1 de Dengue Vírus produzido em camundongo (Abcam, ab41616, lote GR59993) foi selecionado por apresentar os melhores resultados para, junto com o anticorpo de coelho policlonal anti-dengue NS1 tetravalente produzindo neste trabalho, formar o par captura-deteção.

Para produzir um ensaio quantitativo da proteína NS1, o anticorpo comercial foi utilizado como anticorpo de captura na diluição de 1:5 conforme recomendação do fabricante. A curva de diluição da proteína foi estabelecida com a concentração inicial de $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ e 12 diluições sucessivas na ordem de três foram realizadas.

Situações distintas foram testadas: uma curva foi estabelecida com uma mistura dos quatro antígenos simultaneamente, sendo 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de cada sorotipo viral, gerando uma solução final de concentração 10 $\mu\text{g/ml}$; e curvas individuais para as proteínas de cada sorotipo, com a concentração inicial de 10 $\mu\text{g/ml}$ (figuras 43 e 44).

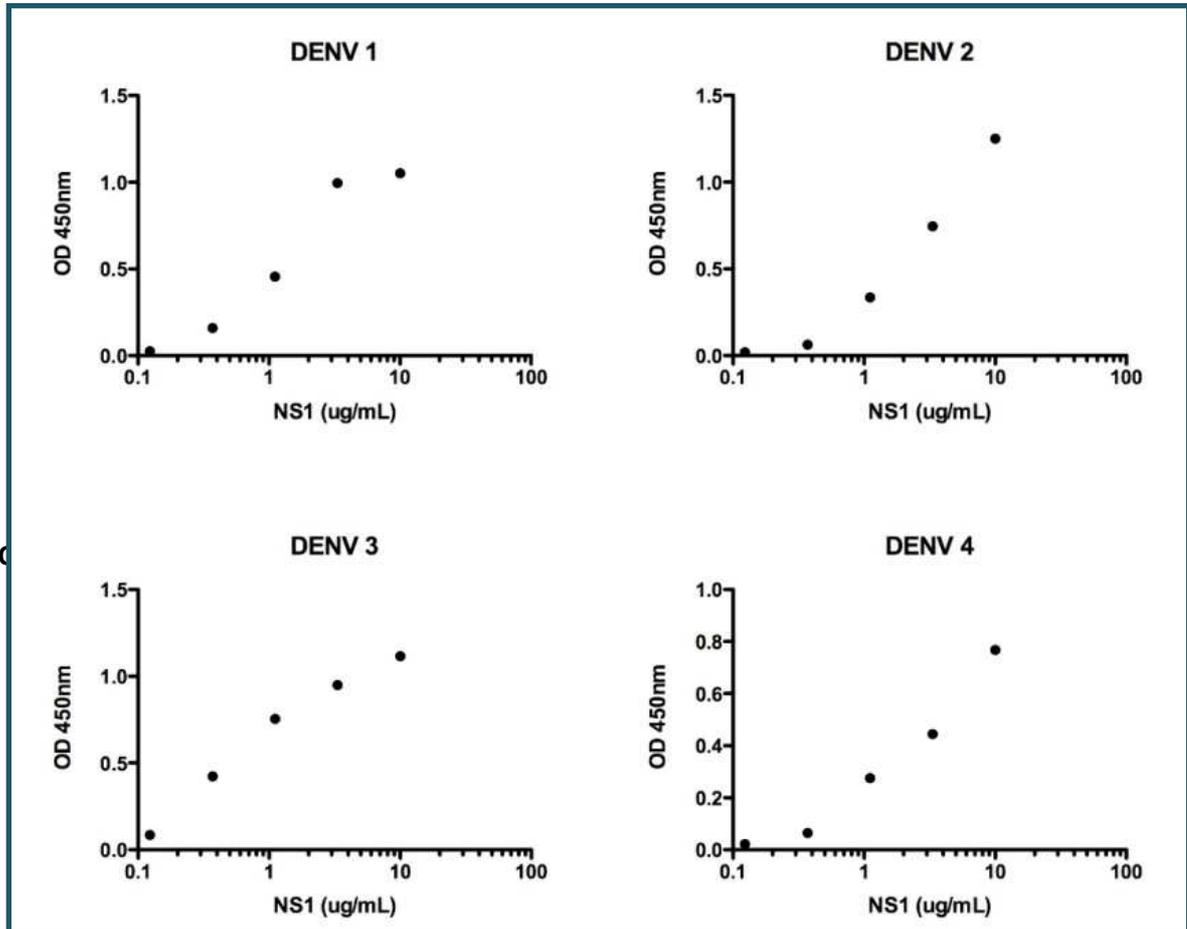
Figura 41 - Curva de detecção para o antígeno DENV NS1 dos quatro sorotipos virais através de ELISA de captura.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A concentração inicial da solução contendo as quatro proteínas dengue NS1 foi 10 $\mu\text{g/ml}$, sendo 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de proteína de cada sorotipo viral. Foram realizadas diluições seriadas na ordem de 3 para construção da curva de diluição.

Figura 42 - Curvas de detecção para o antígeno DENV NS1, geradas individualmente para cada sorotipo viral, através de ELISA de captura.



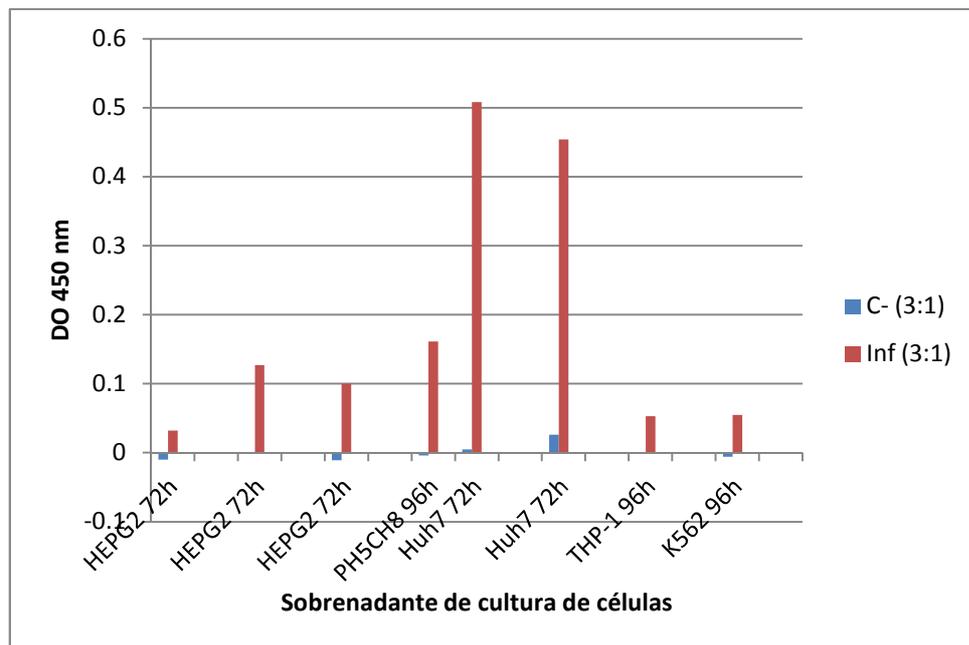
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Em A para D: Curvas-padrão para quantificação da proteína DENV NS1 sorotipo 1 a 4, respectivamente. A concentração inicial da solução, contendo DENV NS1 sorotipo específica, para cada um dos ensaios foi 10 $\mu\text{g/ml}$. Foram realizadas diluições seriadas na ordem de 3 para construção da curva de diluição.

O nível de detecção obtido em nossos ensaios (em torno de 0.4 $\mu\text{g/ml}$) é um ótimo resultado se levarmos em consideração o nível de NS1 em soro de pacientes infectados na fase aguda da doença. Segundo a literatura, os níveis NS1 circulantes variam entre os indivíduos durante o curso da doença, e vão desde nanogramas por mililitro a vários microgramas por mililitro, com um caso documentado de valores de até 50 $\mu\text{g/ml}$ de proteína NS1 no soro (ALCON *et al.*, 2001). As concentrações de NS1 não diferem significativamente nas amostras de soro obtidas a partir de doentes com infecções primárias ou secundárias (ALCON *et al.*, 2001). Estas descobertas indicam que a detecção da proteína NS1 pode permitir o diagnóstico precoce da infecção e sugerem mais uma aplicação para o ensaio quantitativo de DENV NS1 estabelecido neste trabalho.

Para testar o sistema de detecção e quantificação estabelecido, sobrenadantes de cultura de diferentes linhagens celulares infectadas com DENV foram testados. A figura 45 mostra as leituras de densidade óptica para o sobrenadante de cultura de células infectadas (em vermelho) e células controle não-infectadas (em azul), obtidas para cada uma das linhagens infectadas testadas. Importante destacar que para realizar as dosagens, todas as amostras de sobrenadante de cultura foram concentradas 3:1.

Figura 43 - Quantificação da proteína NS1 por ELISA de captura de amostras concentradas 3:1 de sobrenadantes de cultura de células infectadas com DENV.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Comparativamente ao controle negativo (C-) todas as culturas celulares apresentaram DO mais elevada para as células infectadas, o que representa a proteína NS1 detectável pelo método utilizado. Os sobrenadantes foram concentrados 3:1 em todas as amostras analisadas.

Para a quantificação das proteínas DENV NS1 utilizando as leituras de densidade óptica obtidas, curvas padrão para a quantificação de NS1 dos sorotipos 2 e 3 foram realizadas simultaneamente na placa teste, e os valores de DO puderam ser relacionados com a quantidade de proteína NS1, através da plotagem dos valores obtidos nas amostras nos valores da curva-padrão. Os cálculos foram realizados utilizando o programa Graph Pad Prism. O sistema foi capaz de detectar a proteína DENV NS1 em todos os sobrenadantes de cultura testados, comparativamente ao controle de células não-infectadas. Isso mostra a eficiência do sistema, e sugere que o mesmo pode ser utilizado como sistema marcador de infecção viral em cultura de células, através da detecção da proteína DENV NS1 como

produto da replicação do vírus. Os valores de DO obtidos para os sobrenadantes de cultura de células das diferentes linhagens testadas, juntamente com os valores calculados de quantidade de NS1 nas amostras está listado na tabela 3.

Tabela 3 - Valores de concentração (em µg/ml) de proteína DENV NS1 obtidos em sobrenadantes de cultura testados por ELISA de captura.

	OD 450nm (corrigida pelo branco)		NS1 (µg/mL)	
	C- (3:1)	Inf (3:1)	C- (3:1)	Inf (3:1)
DENV3 HEPG2 72h	-0.01	0.032	0.082788	0.201139
DENV2 HEPG2 72h	0	0.127	0.110982	0.478107
DENV2 HEPG2 72h	-0.011	0.1	0.079961	0.397386
DENV2 PH5CH8 96h	-0.004	0.161	0.099718	0.582547
DENV2 Huh7 72h	0.005	0.508	0.12505	1.912171
DENV2 Huh7 72h	0.026	0.454	0.184184	1.664614
DENV2 THP-1 96h	0	0.053	0.110982	0.260849
DENV2 K562 96h	-0.006	0.055	0.09408	0.266571

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os valores de DO foram subtraídos do valor médio do branco de cada curva, e extrapolados para a curva padrão da proteína correspondente ao sorotipo viral utilizado na infecção (DENV 2 ou 3), sendo possível então calcular a quantidade de proteína presente no sobrenadante com o uso do programa Graph Pad Prism. C- representa amostras controle não-infectadas. Inf: amostras infectadas.

De acordo com os resultados obtidos, o anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente mostrou-se aplicável como anticorpo de detecção para ensaios de ELISA de captura para o antígeno DENV NS1, tanto recombinante quanto advindo de infecções naturais. Foi estabelecido ainda um bem-sucedido ensaio quantitativo da proteína DENV NS1. Os anticorpos produzidos e o sistema de ELISA de captura desenvolvido podem ser utilizados para desenvolvimento de kits de diagnóstico de infecção recente por DENV, a partir do diagnóstico de fase aguda com detecção de antígeno DENV NS1 circulante em altas quantidades no soro de pacientes (BUCHY *et al.*, 2000).

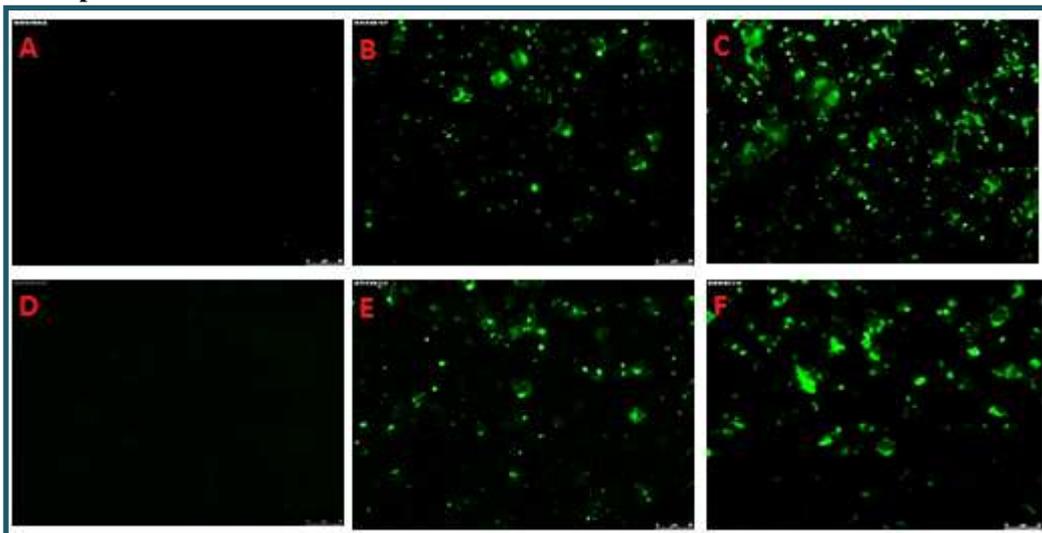
6.6.2 Imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente

O anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente produzido foi também testado através de ensaios de imunofluorescência indireta, quanto ao reconhecimento da infecção por DENV em cultura de células infectadas. Os quatro sorotipos virais foram testados, para comprovar a capacidade do anticorpo de reagir com todas as quatro proteínas NS1 de DENV. Células Vero e células C6/36 infectadas com os quatro sorotipos virais foram utilizadas para testar a sensibilidade do anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente em ensaios de imunofluorescência.

Tanto para as células C6/36 (figura 46) quanto para as células Vero (figuras 47 e 48), os anticorpos foram eficientemente capazes de reconhecer a proteína viral. Para células C6/36, foram testadas diluições de até 1:2000 em 1x PBS. O soro pré-imune foi não-reagente para todos os sorotipos testados (dados não mostrados).

É importante destacar que o anticorpo produzido contra a proteína recombinante produzida e renaturada neste trabalho, através deste experimento, se mostra capaz de reconhecer a proteína viral nativa em reais condições de infecção, tanto a proteína produzida em células de inseto (C6/36) quanto em células de mamífero (Vero).

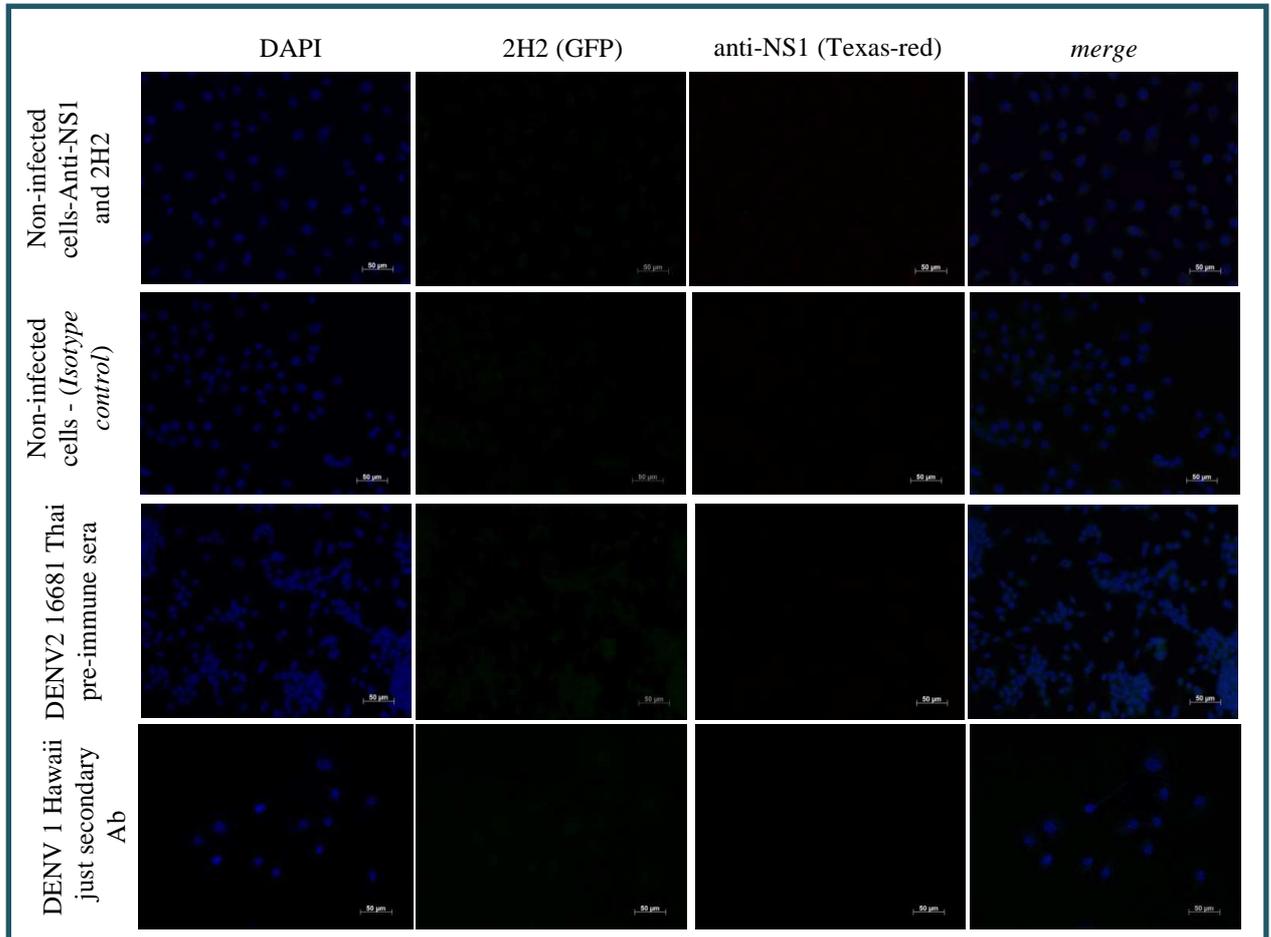
Figura 44 - Imunofluorescência indireta para DENV em células C6/36 utilizando o anticorpo anti-dengue NS1 policlonal produzido em coelho.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Em A: Controle negativo com células não-infectadas. Em B, DENV-1 (PE/97-42735); C, DENV-2 (PE/95-3808); E, DENV-3 (PE/02-95016), e F, DENV-4 isolado em Roraima (Boa Vista) em 1981, doação do Instituto Evandro Chagas, Belém, PA. Em D: Soro pré-imune testado contra células C6/36 infectadas com DENV-2 (PE/95-3808).

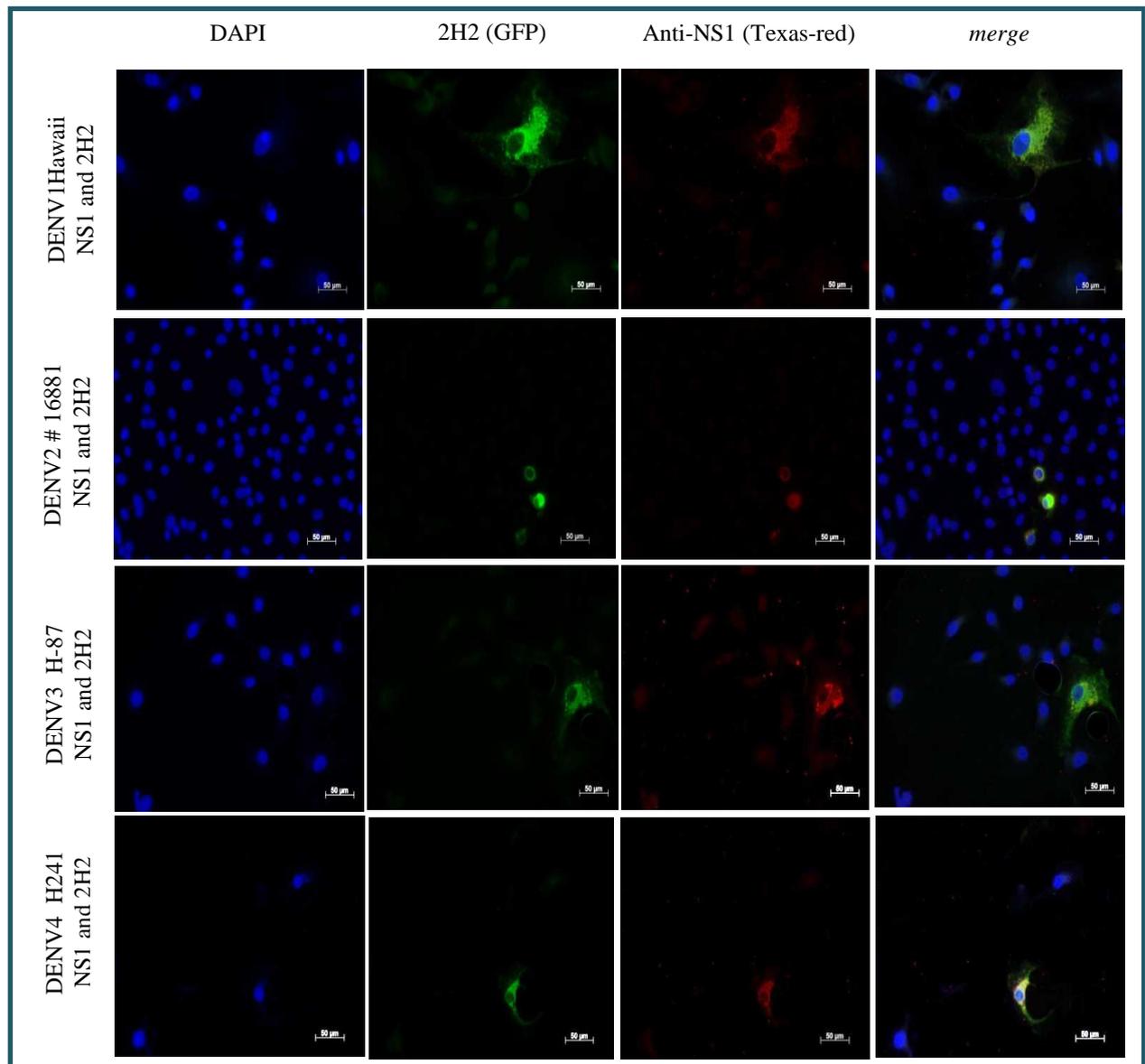
Figura 45 - Controles negativos para imunofluorescência indireta para DENV em células Vero usando os anticorpos anti-dengue NS1 tetravalente e 2H2.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os controles de isotipo utilizados foram *Mouse IgG2a, κ Isotype Control* (catálogo 553454, BD Bioscience) e *Purified Rabbit IgG* (catálogo 02-6102, Invitrogen). Todos os controles foram negativos para detecção de DENV por 2H2 ou anti-dengue NS1 tetravalente. O controle com o soro pré-imune e utilizando apenas o anticorpo secundário foram realizados para todos os demais sorotipos virais (dados não mostrados).

Figura 46 - Imunofluorescência indireta para DENV em células Vero usando os anticorpos anti-dengue NS1 tetraivalente e 2H2.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os quatro sorotipos testados (DENV1 Hawaii, DENV2 16681 Thai, DENV3 H-87 e DENV4 H-241) reagiram positivamente com os anticorpos 2H2 e anti-dengue NS1 tetraivalente, e a marcação dos anticorpos 2H2 e anti-dengue NS1 tetraivalente foi co-localizada nas células infectadas.

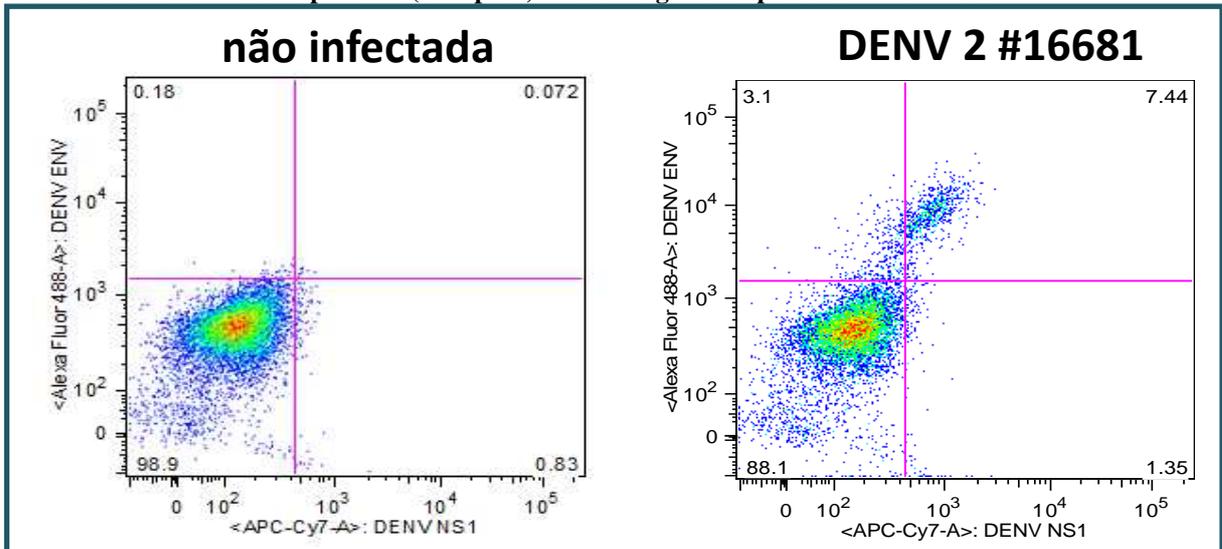
A capacidade do anticorpo em reconhecer a proteína em células fixadas pode ser estendida para a aplicação em diagnóstico de dengue fatal em estudos imunohistoquímicos de tecidos provenientes de pacientes com suspeita de dengue como causa de morte, porém não reagentes a ensaios sorológicos de detecção de IgG. No estudo de Queiroz-Lima (2011), pacientes com essas características apresentaram antígeno NS1 detectável por ensaios de captura em tecidos como fígado, baço, cérebro e pulmão.

6.6.3 Citometria de Fluxo

As células foram ainda analisadas em um citômetro de fluxo BD LSRII (BD Biosciences), utilizando o *software* BD FACSDiva™ versão 6.0. Para cada teste, foram avaliados dez mil eventos. A expressão da proteína DENV NS1 em cultura de células HepG2 infectadas (*infected cells*) com a cepa DENV2 16681 Thai, MOI de 1 após 96 h de infecção e em células não-infectadas (controle negativo), foi verificada utilizando o anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente. Paralelamente, as células foram verificadas quanto à infecção por DENV através do anticorpo comercial 2H2 (Millipore), que reage com a proteína prM de todos os sorotipos virais. Os controles de isotipo utilizados foram *Mouse IgG2a, κ Isotype Control* (catálogo 553454, BD Biosciences) e *Purified Rabbit IgG* (catálogo 02-6102, Invitrogen), nas mesmas concentrações dos anticorpos-teste. O anticorpo secundário anti-IgG de coelho foi conjugado a APC-Cy7-A, correspondendo a fluorescência para leituras de anti-dengue NS1 policlonal tetravalente, e o anticorpo secundário para anti-IgG de camundongo foi conjugado a Alexa-fluor 488, correspondendo ao sinal de leitura para 2H2.

A análise da citometria de fluxo mostrou a bem-sucedida aplicação do anticorpo anti-dengue NS1 policlonal tetravalente para mais uma técnica, como visto nas figuras 49 e 50. Entre as células não-infectadas, 98,9% foram negativas tanto para a marcação com 2H2 quanto anti-dengue NS1 policlonal tetravalente. Apenas 0.18% das células foram positivas unicamente para 2H2, 0.83% positivas unicamente para anti-dengue NS1, e 0.072% positivas para ambos, o que revela que a especificidade do nosso anticorpo é comparável a do anticorpo comercial. Entre as células infectadas, 88,1% foram negativas tanto para 2H2 quanto anti-dengue NS1, 3,1% foram positivas apenas para 2H2 e 1,35% positivas apenas para anti-dengue NS1 policlonal tetravalente. A percentagem de células duplamente positivas (marcadas com 2H2 e anti-dengue NS1 policlonal tetravalente, simultaneamente) foi de 7,44%, sendo portanto a maioria entre as células infectadas. Um ponto a ser destacado é que a marcação realizada neste experimento foi intracelular, e a proteína DENV NS1 é reconhecidamente exportada em grandes quantidades para a membrana da célula infectada, como revisado por Amorim *et al.*, 2010 e Allonso *et al.*, 2011. Um próximo experimento interessante seria realizar uma marcação de superfície celular para a proteína DENV NS1, e comparar com os resultados obtidos nesse experimento.

Figura 47 - Citometria de fluxo para células HepG2 infectadas e não-infectadas, realizando marcação intracelular com os anticorpos 2H2 (Millipore) e anti-dengue NS1 policlonal tetravalente.

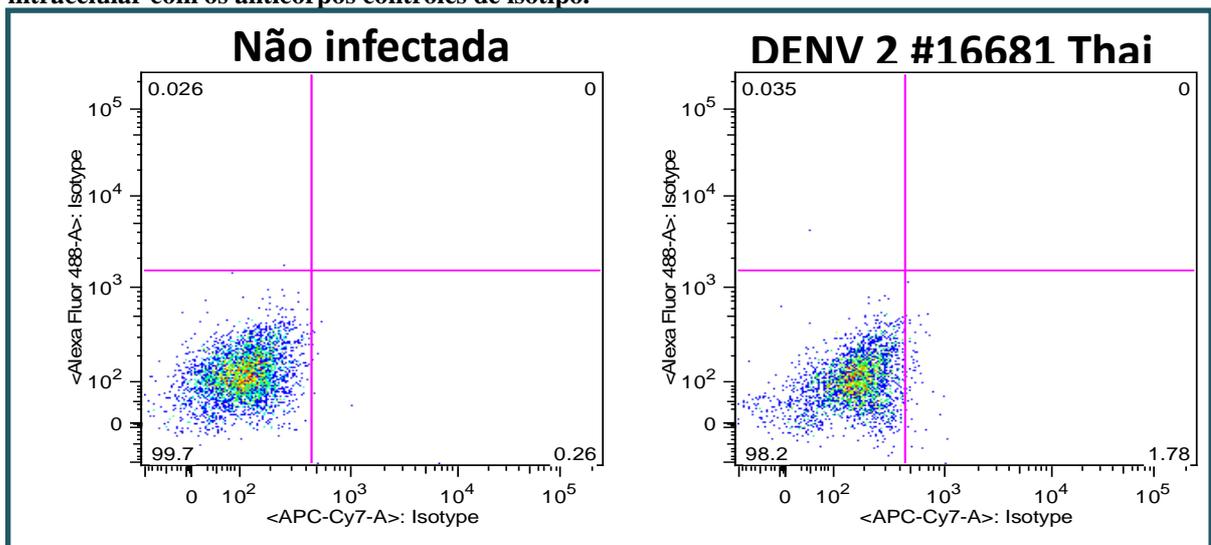


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Para as células não-infectadas, 98,9% foram negativas para a marcação com 2H2 e anti-dengue NS1 policlonal tetravalente, 0,18% foram positivas para 2H2, 0,83% positivas para anti-dengue NS1, e 0,072% positivas para ambos. Entre as células infectadas, 88,1% foram negativas tanto para 2H2 quanto anti-dengue NS1, 3,1% foram positivas apenas para 2H2 e 1,35% positivas apenas para anti-dengue NS1. A percentagem de células duplamente positivas foi de 7,44%.

A figura 50 mostra os gráficos de citometria de fluxo para os controles de isotipo testados, tanto para coelho quanto para camundongo, que, como esperado, não foram capazes de marcar as células infectadas por DENV 2 cepa 16681 Thai.

Figura 48 - Citometria de fluxo para células HepG2 infectadas e não-infectadas, realizando marcação intracelular com os anticorpos controles de isotipo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os controles de isotipo utilizados foram *Mouse IgG2a, κ Isotype Control* (catálogo 553454, BD Biosciences) e *Purified Rabbit IgG* (catálogo 02-6102, Invitrogen), nas mesmas concentrações dos anticorpos-teste, e não foram observadas reações positivas de marcação significativas em nenhuma das condições testadas (células infectadas ou não).

6.7 Ensaios de Microarranjos Líquidos

Este trabalho envolveu a construção, clonagem, expressão e purificação de seis DENV antígenos, sendo eles:

- Proteína DENV NS1 completa – sorotipos 1 a 4 (utilizando duas metodologias para renaturação, totalizando oito diferentes proteínas)
- Proteína DENV ENV (domínios I/II) – sorotipos 1 e 2

Proteínas comerciais foram adquiridas para serem usadas como proteínas controles de diagnóstico, além de ferramentas necessárias para complementar o diagnóstico dos sorotipos 3 e 4 no caso das proteínas DENV ENV. São elas:

- proteína DENV ENV completa - sorotipos 1 a 4 (Prospec)
- proteína DENV ENV completa – sorotipo 2 (MyBiosource)
- proteína DENV ENV (domínios I/II) – sorotipos 1 a 4 (MyBiosource)
- proteína DENV ENV (domínio III) – sorotipos 1 a 4 (Prospec)
- proteínas quimeras DENV ENV 22 kDa (regiões N-terminal imunodominantes) – sorotipos 1 a 4 (Prospec)
- proteína quimera DENV ENV 15 kDa (regiões imunodominantes do domínio III) – sorotipo 2 (Prospec)
- proteína quimera DENV polivalente (25% de cada antígeno DENV ENV recombinante de 22 kDa) (Prospec)

Para os ensaios de validação dos antígenos recombinantes através da técnica de microarranjos líquidos, cada uma das proteínas produzidas, bem como os antígenos comerciais, foram acoplados a um conjunto individual de microesferas, utilizando 1x PBS, pH 7.4 como tampão de acoplamento. Foram testadas diferentes quantidades de proteína a fim de estabelecer as melhores condições a serem aplicadas. A fim de determinar a ótima concentração de proteína para o acoplamento, diferentes concentrações de proteína foram testadas para cada antígeno, variando numa faixa de 25 µg/ml a 100 µg/ml de proteína para cada 625.000 microesferas a serem acopladas.

As concentrações selecionadas para cada antígeno foram: para DENV NS1 proteínas: 50 µg/ml de proteína para cada 625.000 microesferas; para DENV1 ENV (domínios I/II) *in*

house, DENV ENV domínio III (Prospec) e proteínas ENV quiméricas (Prospec): 100 µg/ml de proteína para cada 625.000 microesferas; para DENV1 ENV(domínios I/II) *in house*, proteínas DENV ENV completas (Prospec e MyBiosource) e proteínas DENV ENV (domínios I/II, MyBiosource): 25 µg/ml de proteína para cada 625.000 microesferas.

Os conjuntos de microesferas, após o acoplamento, foram testados contra um *pool* de soros de pacientes DENV infectados (DENV+) e pacientes DENV negativos. O grupo de pacientes negativos continha amostras de pacientes imunizados com a vacina de vírus atenuado da febre amarela (YF+, DENV-), um vírus estreitamente relacionado com o vírus DENV, que apresenta alta reação cruzada com infecções por DENV em ensaios diagnósticos, além de pacientes duplamente negativos (DENV-, YF-). Diferentes diluições das amostras de soro também foram testadas, e a diluição final de 1:100 foi selecionada para ser utilizada em todos os ensaios deste trabalho. Dessa forma, para cada proteína foram estabelecidas as condições ótimas de acoplamento, bem como de ensaio sorológico que melhor conseguiram diferenciar os grupos de amostras positivos e negativos para DENV, através da realização de ensaios *singleplex* (para um único analito por vez).

Após o estabelecimento desses critérios, cada conjunto de microesferas acopladas ao seu respectivo antígeno foi padronizado para realização de ensaios *multiplex* (vários analitos simultaneamente). Para tanto, a concentração de microesferas por poço, a diluição do soro e as configurações de leitura do equipamento foram padronizadas. Por exemplo, para um ensaio *multiplex* de quatro diferentes analitos, as amostras de soro ou plasma foram testadas na diluição final de 1:100, para cada conjunto de microesferas foi colocado numa concentração de 2500 microesferas por poço, o volume final da reação a ser lido pelo aparelho foi de 100 µl, sendo a máquina configurada para aspirar 75 µl e deles contar 50 microesferas de cada espécie.

6.7.1 Proteínas DENV NS1

Os ensaios para as proteínas NS1-ASB e NS1-rec foram realizados em sistema *multiplex* com uso de quatro conjuntos de microesferas simultaneamente, cada uma acoplada a uma proteína por sorotipo viral, e os ensaios com as proteínas obtidas pelos dois métodos de renaturação foram realizados em paralelo para estabelecer a comparação entre as duas metodologias na geração de proteínas capazes de reconhecer os anticorpos, em soro ou plasma de pacientes que sofreram infecções por DENV.

As proteínas NS1-ASB e NS1-rec foram testadas contra 184 amostras, sendo 126 amostras positivas e 58 amostras negativas. Dentre as amostras negativas, 21 são amostras de pacientes vacinados para febre amarela, um flavivírus estreitamente relacionado com DENV, e reconhecidamente responsável por reações cruzadas em testes de diagnóstico (SILVA-NUNES, MALAFRONTTE; ALMEIDA LUZ *et al.*, 2006; MARIANNEAU *et al.*, 1998; MUYLAERT *et al.*, 1988). Como revisto pelo trabalho de de Lima *et al.* (1999) existem dificuldades de análise sorológica para dengue em populações com antecedentes de vacinação para febre amarela e em regiões onde há provavelmente circulação de outros flavivírus.

A reação antígeno-anticorpo foi analisada em termos de MFI, e os resultados foram submetidos à análise estatística através da curva ROC para a determinação do ponto de corte (*cut-off*) correspondente ao par sensibilidade/especificidade de maior acurácia. A curva ROC é uma ferramenta poderosa para medir e especificar problemas no desempenho do diagnóstico, por permitir estudar a variação da sensibilidade e especificidade para esses diferentes valores de corte (BRAGA, 2003).

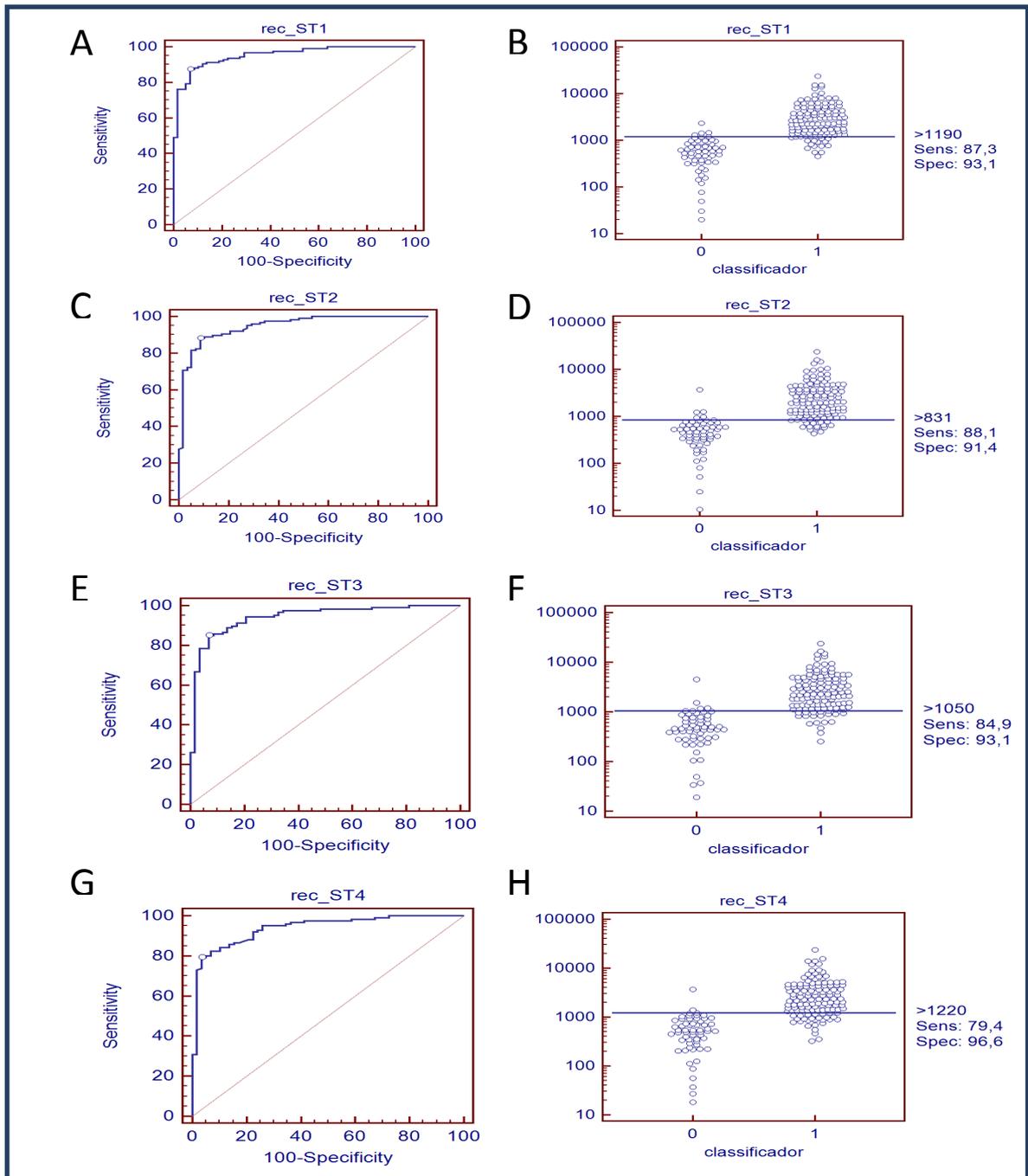
As figuras 51 e 52 mostram as curvas ROC, os resultados de sensibilidade e especificidade, o *cut-off* e a distribuição das amostras por grupos (positivas, 1 e negativas, 0) em intensidade de MFI convertida em escala logarítmica para cada um dos antígenos NS1-rec e NS1-ASB, respectivamente.

Na curva ROC, a linha diagonal pontilhada corresponde a um teste que é positivo ou negativo, aleatoriamente. A curva ROC permite evidenciar os valores para os quais existe maior otimização da sensibilidade em função da especificidade, que corresponde ao ponto que se encontra mais próximo do canto superior esquerdo do diagrama. O valor do ponto de corte é definido com um valor que pode ser selecionado arbitrariamente pelo pesquisador entre os valores possíveis para a variável de decisão, acima do qual o paciente é classificado como positivo (teste positivo, paciente com a doença) e abaixo do qual é classificado como negativo (teste de diagnóstico negativo, ausência de doença) (BRAGA, 2003).

Para cada ponto de corte são calculados valores de sensibilidade e especificidade, que podem então ser dispostos no gráfico. Um classificador perfeito corresponderia a uma linha horizontal no topo do gráfico. Essa condição, no entanto, dificilmente será alcançada. Na prática, curvas consideradas boas estarão entre a linha diagonal e a linha perfeita, onde quanto maior a distância da linha diagonal, melhor o sistema. A linha diagonal indica uma classificação aleatória, ou seja, um sistema que aleatoriamente seleciona saídas como positivas ou negativas (BRAGA, 2003).

Como podemos ver na tabela 4 e nas figuras 50 e 51, as proteínas NS1-rec foram consideradas mais sensíveis e específicas quando comparadas a segunda metodologia de renaturação, NS1-ASB.

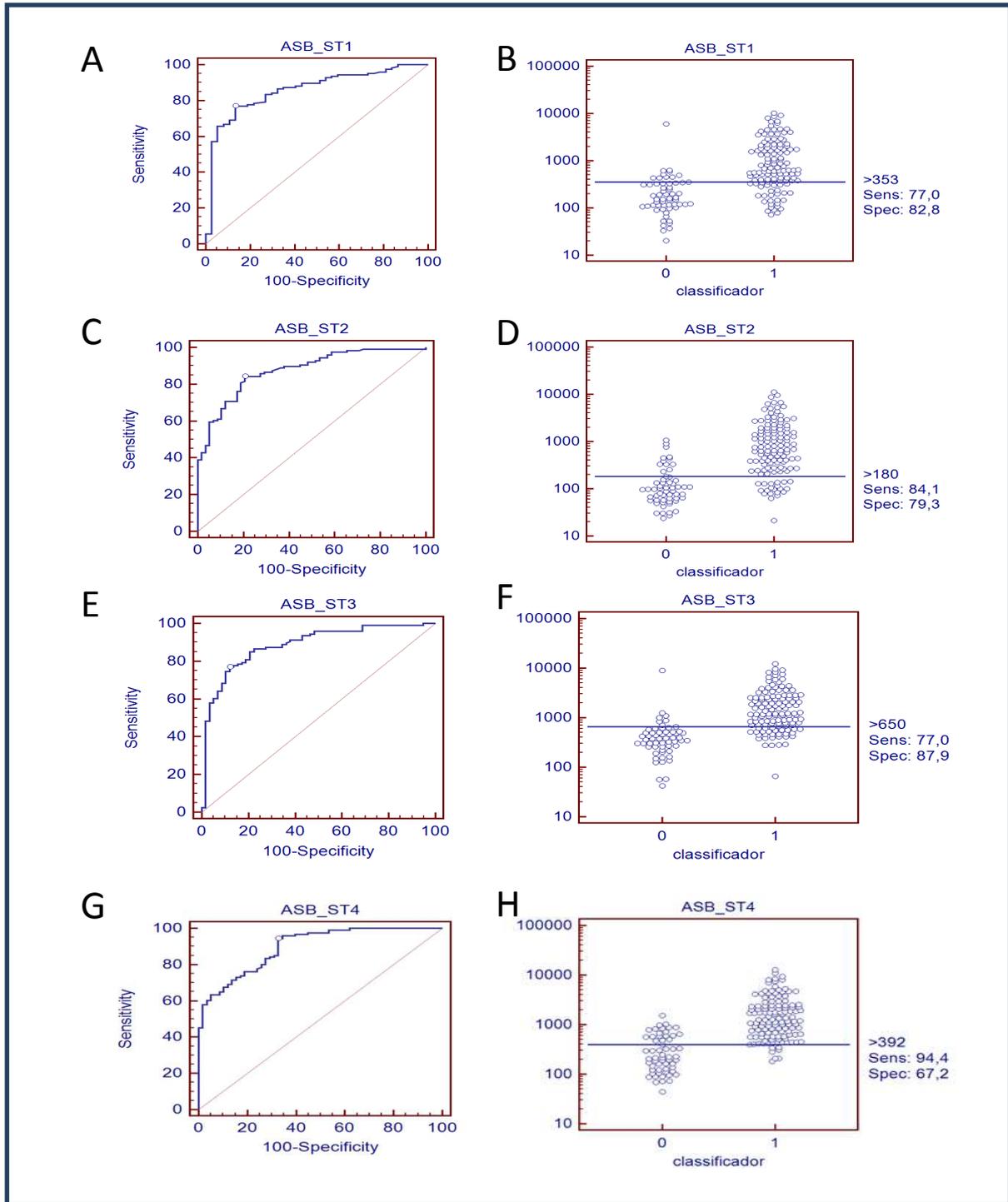
Figura 49 - Avaliação dos antígenos DENV NS1-rec em termos de especificidade e sensibilidade através de ensaios de microarranjos líquidos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os antígenos foram testados contra um painel de 183 amostras, sendo 125 amostras positivas para dengue, e 58 amostras negativas. A MFI emitida pelo anticorpo de detecção foi utilizada para quantificar as reações. Os antígenos renaturados pelo método NS1-rec foram capazes de separar as populações de indivíduos saudáveis (0) e indivíduos positivos (1), como mostrado nos diagramas de dispersão das amostras (B, D, F e G, respectivamente para os sorotipos 1 a 4). Os dados foram submetidos à análise da curva *Receiver Operating Characteristic* – ROC (A, C, E e G, respectivamente para os sorotipos 1 a 4), e os valores de *cut-off* para o melhor par sensibilidade-especificidade foi selecionado (círculo branco).

Figura 50 - Avaliação dos antígenos DENV NS1-ASB em termos de especificidade e sensibilidade através de ensaios de microarranjos líquidos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os antígenos foram testados contra um painel de 183 amostras, sendo 125 amostras positivas para dengue, e 58 amostras negativas. A MFI emitida pelo anticorpo de detecção foi utilizada para quantificar as reações. Os antígenos renaturados pelo método NS1-ASB foram capazes de separar as populações de indivíduos saudáveis (0) e indivíduos positivos (1), como mostrado nos diagramas de dispersão das amostras (B, D, F e G, respectivamente para os sorotipos 1 a 4). Os dados foram submetidos à análise da curva *Receiver Operating Characteristic* – ROC (A, C, E e G, respectivamente para os sorotipos 1 a 4), e os valores de *cut-off* para o melhor par sensibilidade-especificidade foi selecionado (círculo branco).

A tabela 4 sumariza os resultados estatísticos obtidos para as proteínas DENV NS1-ASB e NS1-rec. Para todos os testes, o nível de significância (área de 0.5) foi <0.0001 . A área sob a curva ROC (AUC, *area under curve*) constitui um dos índices mais usados para expressar a qualidade da curva. O conhecimento da área sob a curva possibilita quantificar a exatidão de um teste diagnóstico (proporcional à área sob a curva), além de possibilitar a comparação de diferentes testes. Dessa forma, a área sob a curva ROC é uma medida do desempenho de um teste (índice de exatidão). Um teste totalmente incapaz de discriminar indivíduos doentes e não doentes teria uma área sob a curva em torno de 0.5. Valores acima de 0,70 são considerados de desempenho satisfatório (BRAGA, 2003).

Tabela 4 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV NS1 após renaturação.

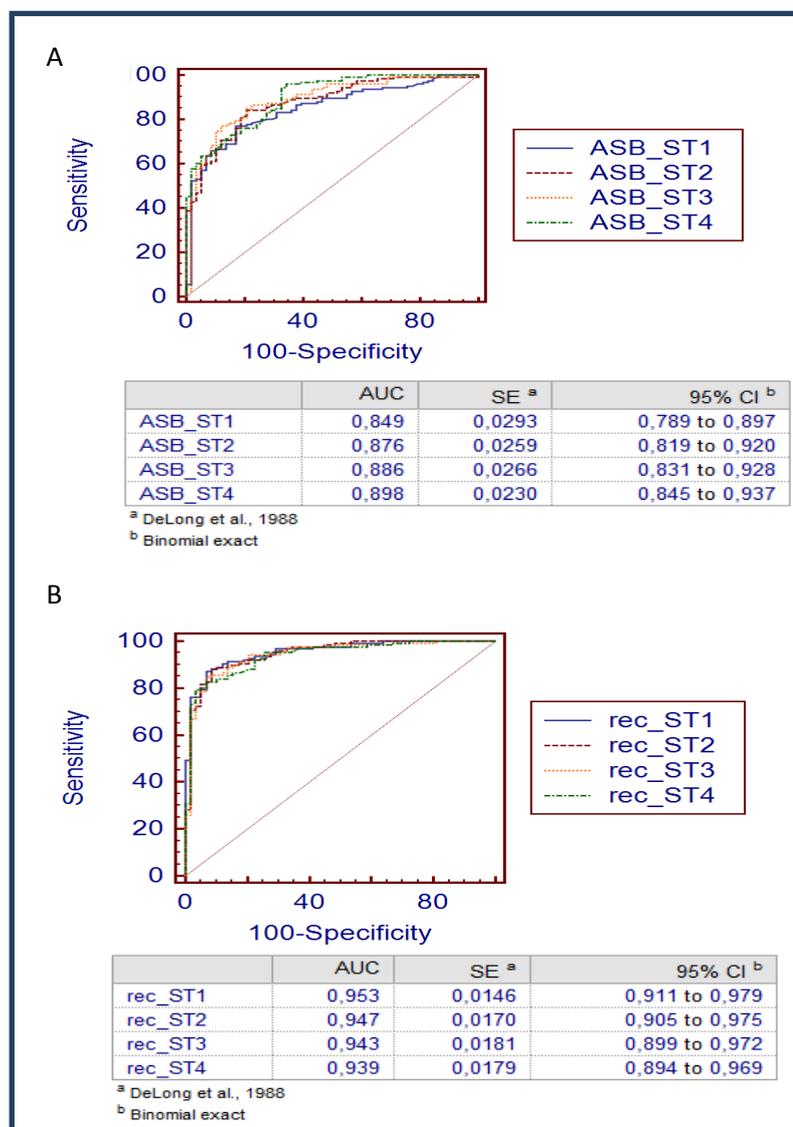
Proteína NS1	Sensibilidade	Especificidade	<i>Cut-off</i>	Área sob a curva	Erro padrão ^a	Interv. confiança 95% ^b
DENV1 rec	87.3%	93.1%	>1190	0.953	0.0143	0.911-0.979
DENV2 rec	88.1%	91.4%	>831	0.947	0.0170	0.905-0.975
DENV3 rec	84.9%	93.1%	>1050	0.943	0.0181	0.899-0.972
DENV4 rec	79.4%	96.6%	>1220	0.939	0.0179	0.894-0.969
DENV1ASB	77.0%	82.8%	>352.5	0.849	0.0293	0.789-0.897
DENV2ASB	84.1%	79.3%	>180	0.876	0.0259	0.819-0.920
DENV3ASB	77%	87.9%	>650	0.886	0.0266	0.831-0.928
DENV4ASB	94.2%	67.2%	>392	0.898	0.0230	0.845-0.937

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A tabela descreve o melhor par sensibilidade-especificidade para cada antígeno, além de mostrar o valor de *cut-off* estabelecido, a área sob a curva ROC, o erro padrão das análises e o intervalo de confiança. Fonte: Dados da autora. ^a DeLong *et al.* (1988). ^b Binomial exata.

A figura 53 mostra os gráficos comparativos entre as curvas ROC separadas por processo de renaturação.

Figura 51 - Comparação entre as curvas ROC dos antígenos DENV NS1-rec e NS1-ASB separados por método de renaturação.



Fonte: Elaborado pela autora.

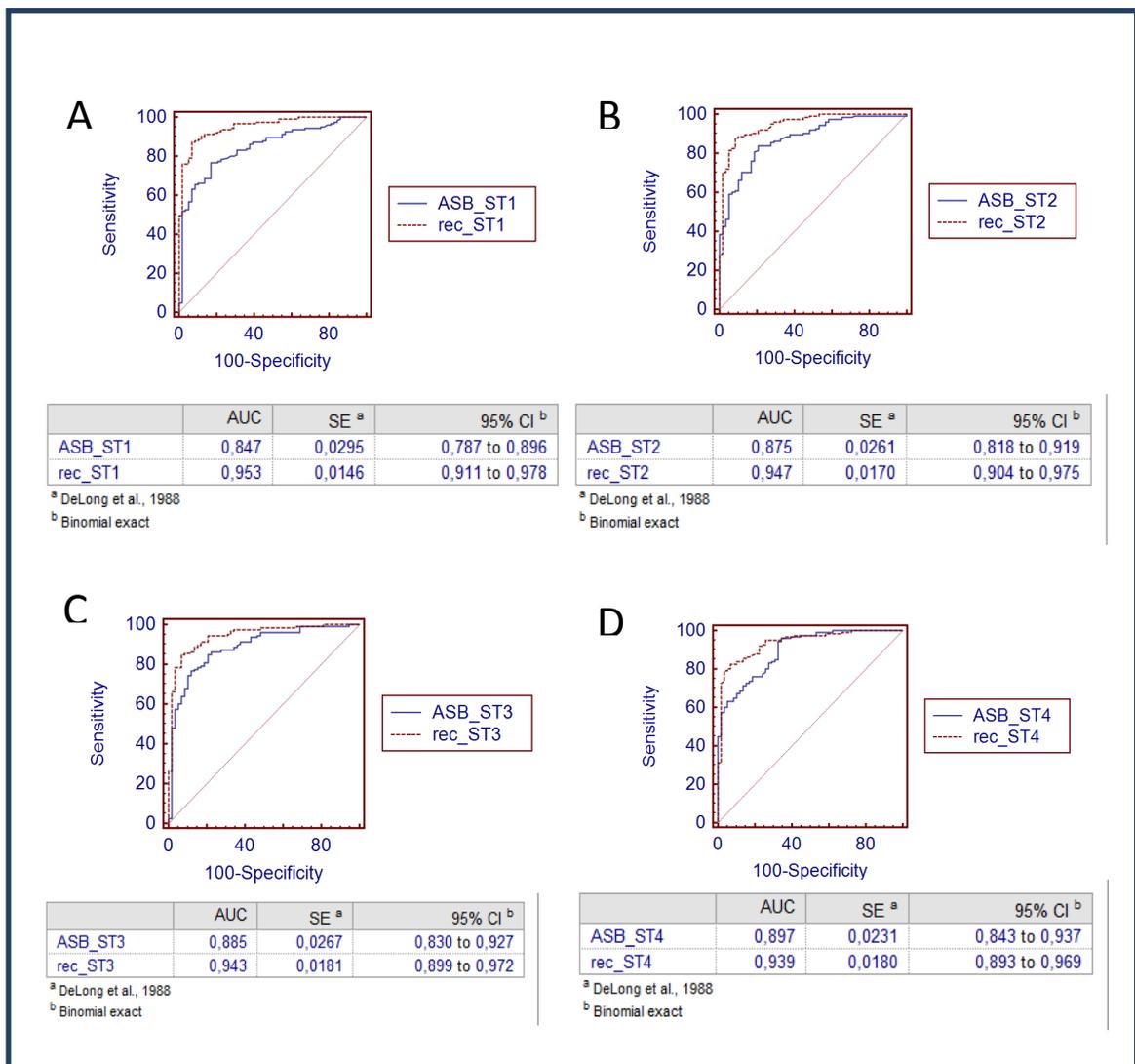
É possível constatar que o desempenho das proteínas NS1-rec é superior que o das NS1-ASB, de acordo com a comparação da área sob a curva obtida (em torno de 0.8 para NS1-ASB, representado em A, e 0.9 para NS1-rec, representado em B).

A comparação entre as AUC das proteínas renaturadas pelo método NS1-rec mostra que as quatro proteínas formam curvas bastante semelhantes entre si, o que pode ser confirmado ao notar que as proteínas NS1 sorotipo 1 e sorotipo 4 apresentaram a maior diferença entre as áreas, porém com valores tão baixos quanto 0.0139. As curvas das proteínas NS1 sorotipo 3 e sorotipo 4, por sua vez foram tão similares que a diferença entre as áreas foi de 0.00417. A similaridade entre as curvas se repete ao analisar as proteínas renaturadas pelo método NS1-ASB, com a maior diferença entre as áreas sendo também entre

NS1 sorotipo 1 e sorotipo 4 (0.0491). As curvas mas similares foram as do sorotipo 2 e sorotipo 3, com a diferença entre AUC de 0.0102.

A figura 54 utiliza o mesmo raciocínio comparativo entre as curvas ROC, mas realiza a análise das proteínas de cada processo de renaturação separadas por sorotipo viral. Dessa forma, é possível notar claramente o melhor desempenho das proteínas NS1-rec em todas os sorotipos testados.

Figura 52 - Comparação entre as curvas ROC dos antígenos DENV NS1-rec e NS1-ASB separados por sorotipo viral.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A comparação das curvas separadas por sorotipo viral mostra a superioridade das proteínas NS1-rec na acurácia de testes diagnósticos para DENV, quando comparadas as proteínas NS1-ASB. O desempenho superior é exibido nos maiores valores de AUC em todos os casos testados. De A para D, sucessivamente, proteínas NS1-ASB e rec sorotipo 1 a 4.

O desempenho das proteínas NS1-rec foi considerado excelente. Cohen *et al.* (2007) para determinar o desempenho dos testes rápidos de diagnóstico para dengue e leptospirose, através da detecção de anticorpos, testaram 723 pacientes com doença febril indiferenciada na Tailândia (usando testes rápidos para detecção de IgM e IgG). A sensibilidade dos testes foi considerada baixa na fase aguda (7,6-21,5%). Durante a fase de convalescença os valores variaram de 25,8% para 81,5% e foi significativamente maior.

Em estudos de fase aguda da doença, Fry e outros (2011) avaliaram o desempenho do teste rápido para detecção de NS1 de dengue recentemente desenvolvido pela empresa Panbio em uma população de 198 indivíduos em fase aguda de infecção e obtiveram valores de sensibilidade e especificidade de 69,2% (95% Intervalo de confiança, IC, 62,8%-75,6%) e 96% (95% IC: 92,2%- 99,8%), respectivamente. Ao testar o mesmo kit em uma população na Malásia, o desempenho foi semelhante com sensibilidade 68,9% (95% IC: 61,8%-76,1%) e especificidade 96,7% (95% IC: 82,8%-99,9%) em comparação a RT-PCR. É importante destacar que, quando o teste foi aplicado em combinação com detecção de IgM / IgG (abordagem aplicada neste trabalho), a sensibilidade foi aumentada para 93,0%, resultados bastante similares aos encontrados neste trabalho (FRY, MEYER, SEMPLE *et al.*, 2011)

Hang e outros (2009), ao testar a sensibilidade e especificidade do ensaio ELISA Platelia NS1 (Biorad) e a prova de fluxo lateral rápida para o antígeno NS1 em população de 138 vietnamitas viram que, em geral, o teste de ELISA Platelia NS1 foi modestamente mais sensível (82%) que a prova de fluxo lateral rápida (72%) nos casos confirmados de dengue.

6.7.2 Proteínas DENV ENV (domínios I/II)

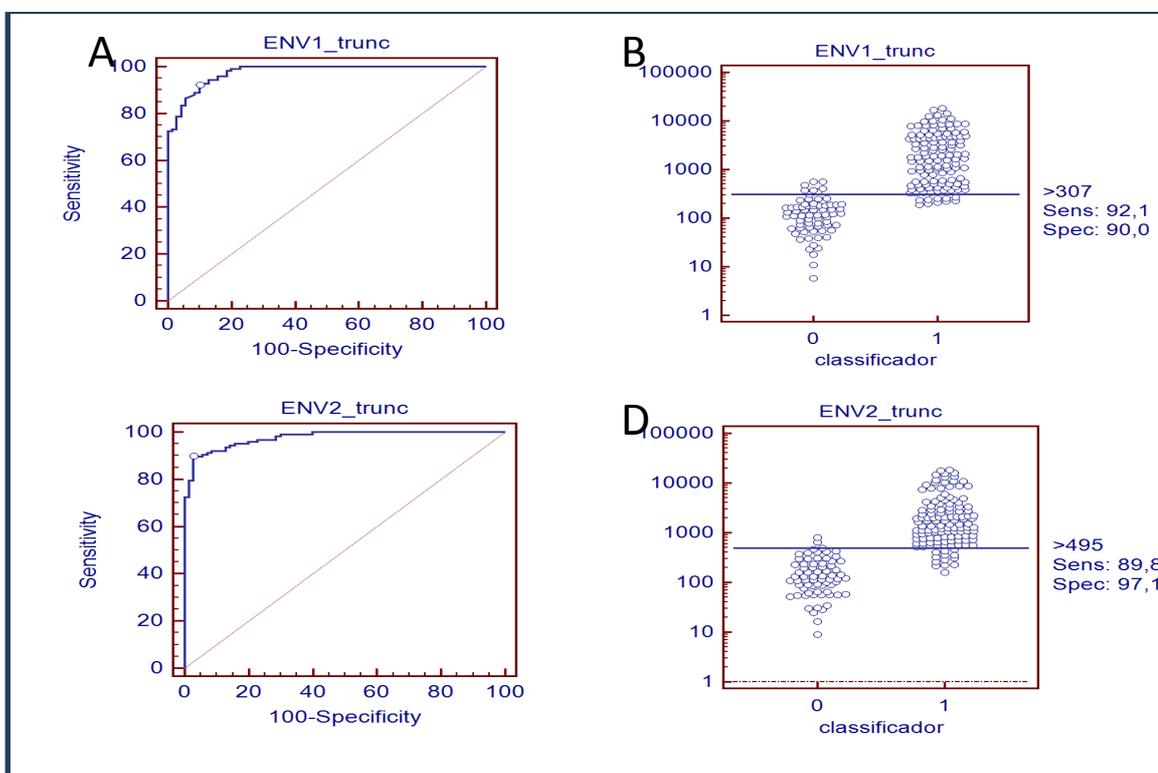
Os ensaios para as proteínas DENV ENV (domínios I/II) sorotipos 1 e 2 foram realizados em sistema *multiplex* (dois conjuntos de microesferas testados simultaneamente). As proteínas foram testadas contra 197 amostras, sendo 127 amostras positivas e 70 amostras negativas. Dentro do grupo de amostras negativas estavam presentes 22 amostras de pacientes vacinados para febre amarela. Da mesma forma que os antígenos NS1, as reações antígeno-anticorpo foram analisadas em termos de MFI, e os resultados foram submetidos à análise estatística através da curva ROC.

Ambas as proteínas foram eficientes em separar as populações de pacientes controle dos pacientes que apresentavam anticorpos para DENV, apresentando a mais alta

sensibilidade e especificidade entre todas as proteínas testadas neste trabalho, superando inclusive as proteínas comerciais (apresentadas na sessão 6.7.3 e seguintes)

A proteína DENV ENV (domínios I/II) sorotipo 1 apresentou sensibilidade de 92,1% e especificidade de 90%, com um valor de corte > 307 MFI. DENV ENV truncada sorotipo 2, por sua vez, teve sensibilidade de 89,8% e especificidade de 97,1%, com valor de corte > 495 MFI. Essas proteínas foram acopladas em sua forma desnaturada (diretamente da purificação com uréia) sem a aplicação de nenhum processo de renaturação, apresentando excelentes resultados, conforme visto na figura 55 e tabela 5.

Figura 53 - Avaliação do desempenho dos antígenos DENV ENV (domínios I/II) sorotipo 1 e 2 através da curva ROC.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A validação dos antígenos DENV ENV (domínios I/II) em termos de especificidade e sensibilidade através de ensaios de microarranjos líquidos foi realizada pela quantificação da MFI emitida pelo anticorpo de detecção, e os resultados foram submetidos à análise estatística. Os antígenos foram testados contra um painel de 197 amostras, sendo 127 amostras positivas para dengue e 70 amostras negativas. Os antígenos foram capazes de separar as populações de indivíduos controle (0) e indivíduos positivos para dengue (1), como mostrado nos diagramas de dispersão das amostras (B e D, respectivamente para os ST 1 e 2). Os dados foram submetidos à análise da curva *Receiver Operating Characteristic* – ROC (A e C, respectivamente para ST 1 e 2), e os valores de *cut-off* para o melhor par sensibilidade-especificidade foram selecionados (círculo branco).

A tabela 5 resume os resultados estatísticos obtidos para as proteínas DENV ENV (domínios I/II) sorotipo 1 e 2. Para todos os testes, o nível de significância (área de 0.5) foi <0.0001 .

Tabela 5 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV (domínios I/II) sorotipo 1 e 2.

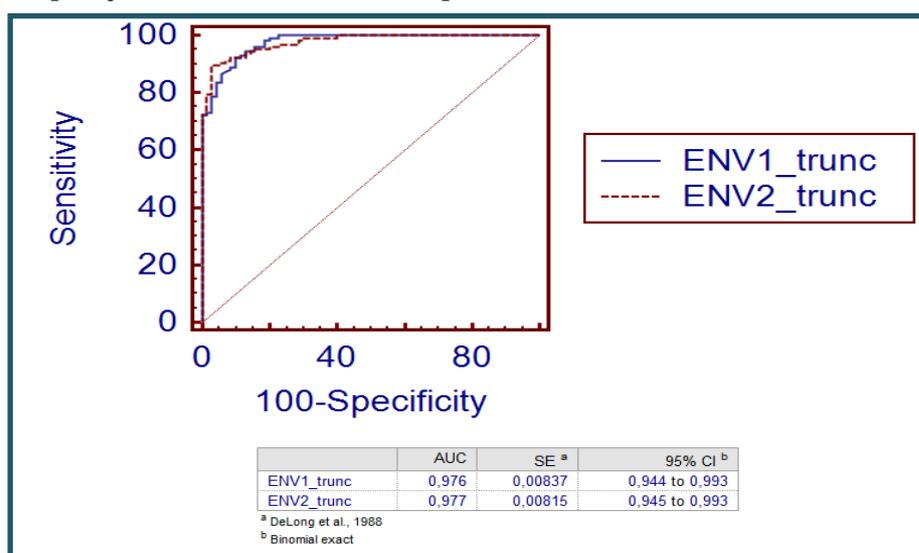
Proteína ENV (domínios I/II)	Sensibilidade	Especificidade	Cut-off	Área sob a curva	Erro padrão ^a	Interv.confiança 95% ^b
Sorotipo 1	92.1%	90.0%	>307	0.976	0.00837	0.944-0.993
Sorotipo 2	89.8%	97.1%	>495	0.977	0.00815	0.945-0.993

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A tabela descreve o melhor par sensibilidade-especificidade para cada antígeno, além de mostrar o valor de *cut-off* estabelecido, a área sob a curva ROC, o erro padrão das análises e o intervalo de confiança ^a DeLong *et al.* (1988). ^b Binomial exata.

Ao comparar diretamente as duas curvas (figura 56), fica destacado que o valor de AUC das curvas ROC foi acima de 0.97 para ambas as proteínas, diferindo em apenas 0.001 (maior para a proteína do sorotipo 2), o que representa um valor altamente significativo, indicando um teste com alta precisão. Além disso, ambos os testes apresentaram um valor extremamente baixo de erro padrão (0.00837 para sorotipo 1 e 0.00815 para sorotipo 2).

Figura 56 - Comparação entre as curvas ROC das proteínas DENV ENV (domínios I/II) sorotipo 1 e 2.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: As duas curvas são altamente similares de acordo com os valores AUC, mostrando testes com alta acurácia e precisão para as duas proteínas testadas.

Branch e Levett (1999) obtiveram resultados comparáveis de sensibilidade ao validar os kits comerciais de diagnóstico PanBio IgM ELISA, 85,5% e PanBio IC, 83,9%. No entanto o mesmo trabalho alcançou valores superiores de sensibilidade para os testes *Integrated Diagnostics* IgM dot ELISA, 96,8% e MRL Diagnostics IgM ELISA, 98,4%. Para todos os casos a especificidade alcançada foi de 100%.

6.7.3 Proteínas comerciais para dengue

6.7.3.1 Proteínas DENV ENV completas sorotipos 1 a 4 (Prospec) e DENV ENV completa sorotipo 2 (MyBiosource)

As proteínas completas DENV ENV completas dos quatro sorotipos virais comercializadas pela empresa Prospec (confrontadas com um painel de 198 amostras, em um total de 124 positivas para anticorpos contra DENV e 74 amostras negativas, dentre estas 24 amostras de pacientes vacinados contra febre amarela - IgG positivos para febre amarela) e a proteína DENV ENV completa sorotipo 2 comercializada pela companhia MyBiosource (testada contra 178 amostras, dentre elas 112 positivas e 66 amostras negativas, sendo 18 amostras de pacientes vacinados para febre amarela) apresentaram um desempenho de uma forma geral razoável para classificar os grupos de amostras positivos e negativos, como pode ser visto nas figuras 57 e 58, com valores de sensibilidade variando de 68% a 84,7% e especificidade variando de 62,2% a 79,5%. A AUC obteve valores sempre muito próximos a 0,8, o que corresponde a valores aceitáveis para um teste diagnóstico de precisão moderada.

A reação antígeno-anticorpo foi analisada em termos de MFI, e os resultados de sensibilidade, especificidade e a determinação do ponto de corte foram obtidos através da análise estatística da curva ROC.

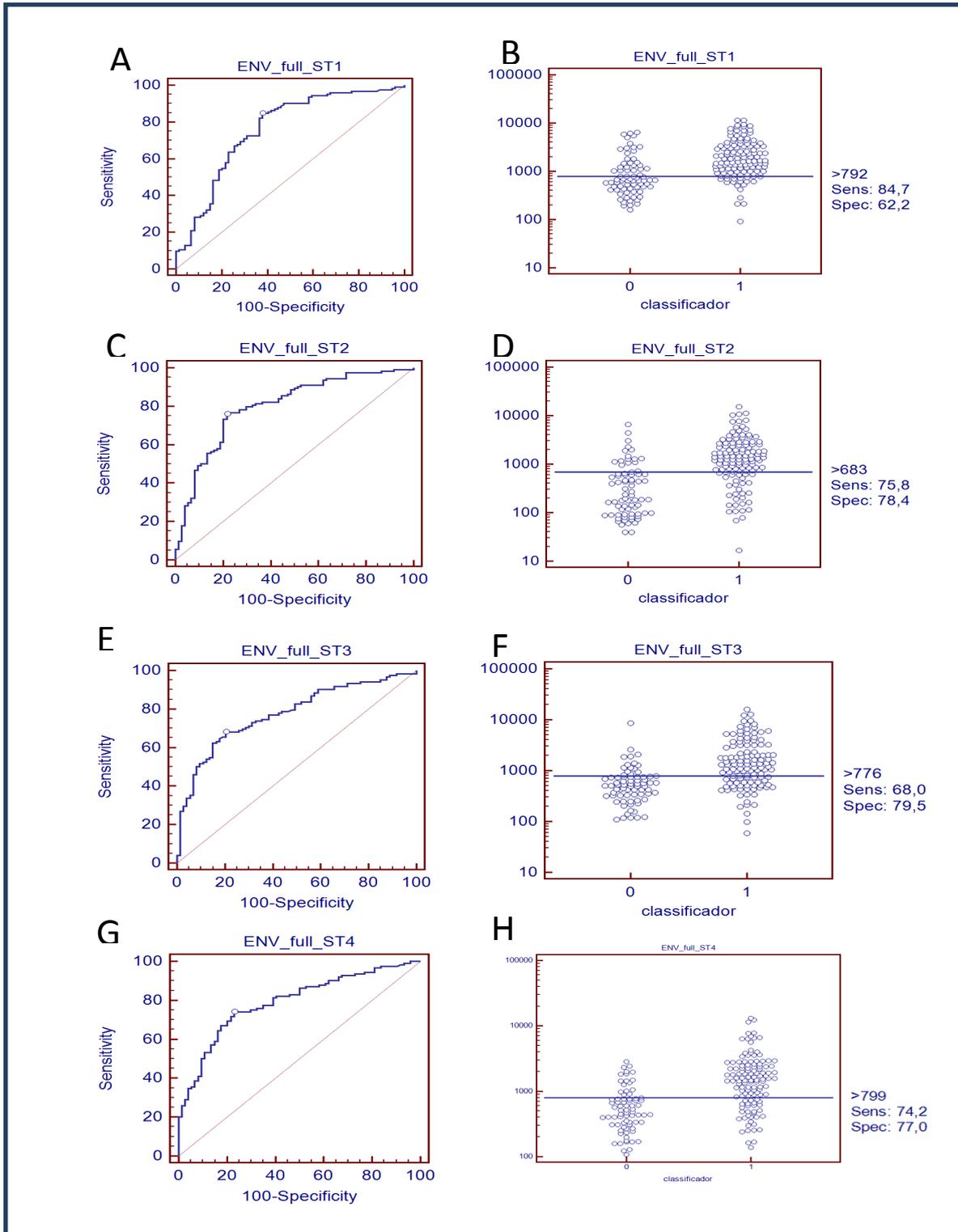
No entanto, quando comparadas as proteínas DENV ENV truncadas sorotipos 1 e 2 (desenvolvidas nesse trabalho), as proteínas completas comerciais apresentam um desempenho consideravelmente menor. Isso de certa forma não é surpreendente pois, apesar de as proteínas completas possuírem mais epítomos e conseqüentemente terem chances aumentadas de serem reconhecidas por anticorpos em amostras de pacientes, as proteínas ENV truncadas desenvolvidas neste trabalho foram produzidas através de seqüências sintetizadas com base em cepas de vírus circulantes em nossa região, visando elevar os níveis de sensibilidade e especificidade dos antígenos. As proteínas comerciais são também

produzidas em bactérias, mas a empresa não relata as condições de purificação e se as amostras foram submetidas a alguma processo de renaturação.

As figuras 57 e 58 mostram as curvas ROC obtidas para cada teste diagnóstico realizado em sistema *multiplex* com cinco conjuntos de microesferas para as proteínas completas comerciais DENV ENV, além do gráfico contendo a comparação final de todas as curvas obtidas. A tabela 6 sumariza os resultados de sensibilidade e especificidade para as proteínas completas comerciais, além dos valores de *cut-off* selecionados. Para todos os testes, o nível de significância (área de 0.5) foi <0.0001 .

Apesar do desempenho das proteínas ter sido bastante comparável, o melhor resultado obtido entre as proteínas comerciais DENV ENV completas foi do antígeno DENV ENV completo sorotipo 4 (Prospec), que apresentou o maior valor de AUC (0.817). O pior desempenho ficou por conta do antígeno DENV ENV completo sorotipo 2 da empresa MyBiosource, com valor de AUC de 0.753, valor inclusive inferior ao obtido pela mesma proteína comercializada pela empresa Prospec (AUC=0.074, com diferença entre os valores de AUC de 0.0216 para estas duas proteínas. Logo, a maior diferença entre as áreas sob as curvas foi notada entre DENV ENV completa sorotipo 2 (MyBiosource) e DENV ENV completa sorotipo 4, equivalente a 0.0642.

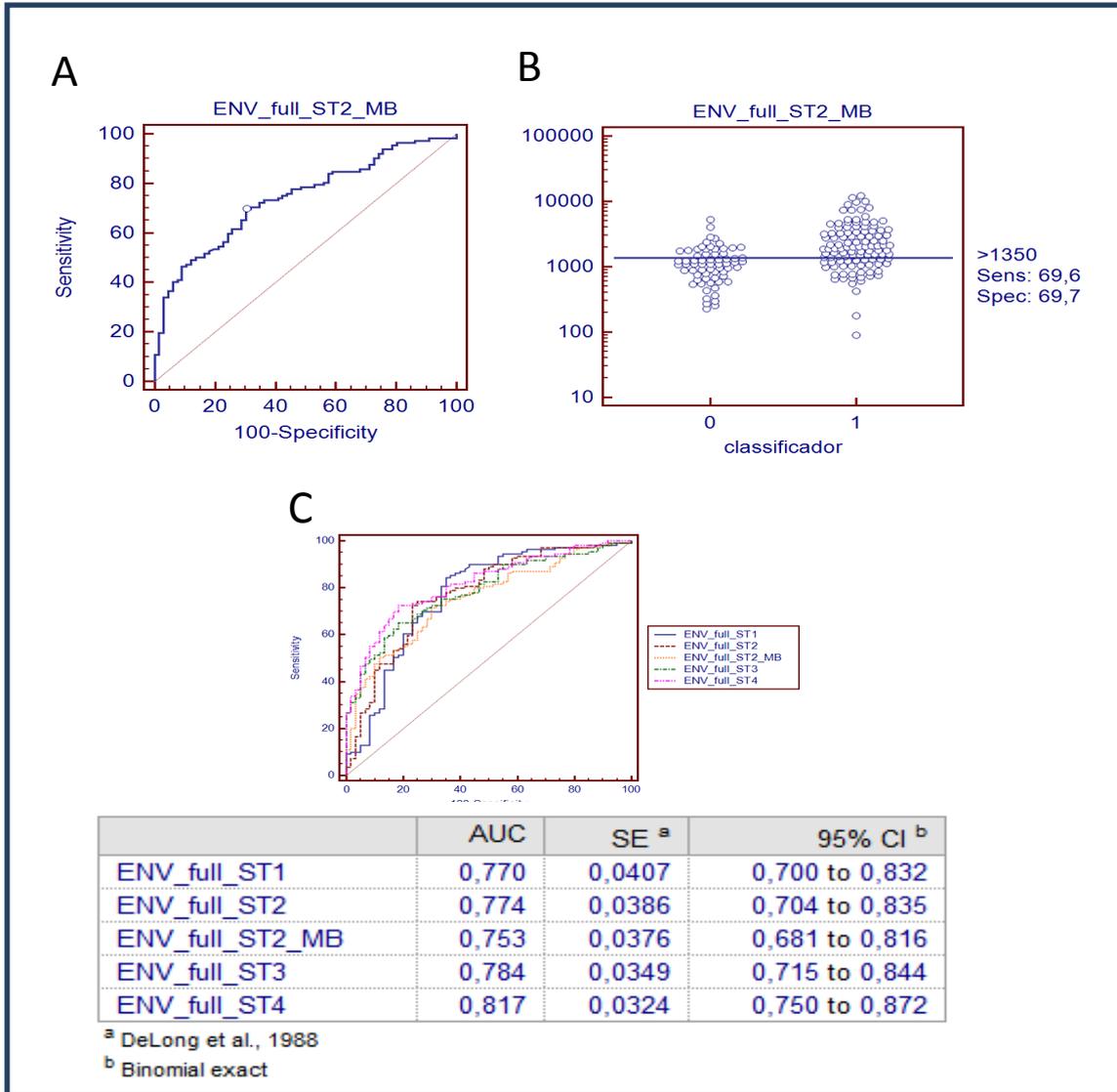
Figura 57 - Avaliação dos antígenos DENV ENV completos comerciais (Prospec), em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os antígenos foram testados contra um painel de 198 amostras, em um total de 124 positivas para anticorpos contra DENV e 74 amostras negativa. A MFI emitida pelo anticorpo de detecção foi utilizada para quantificar as reações. A capacidade de separação entre os grupos controle (0) e pacientes positivos (1) é mostrada no diagrama de dispersão em (B, D, F e G, respectivamente para os sorotipos 1 a 4). Os dados foram submetidos à análise da curva ROC (A, C, E e G, respectivamente para sorotipo 1 a 4), e os valores de *cut-off* para o melhor par sensibilidade-especificidade foram selecionados (círculo branco).

Figura 54 - Avaliação do antígeno DENV ENV sorotipo 2 completo comercial (MyBiosource), em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos e comparação das curvas ROC de todos os antígenos DENV ENV completos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: O antígeno foi testado contra um painel de 178 amostras, dentre elas 112 positivas e 66 amostras negativas. A MFI emitida pelo anticorpo de detecção foi utilizada para quantificar as reações. A capacidade de separação entre os grupos controle (0) e pacientes positivos (1) é mostrada no diagrama de dispersão em B. Os dados foram submetidos à análise da curva ROC (A) e o valor de *cut-off* para o melhor par sensibilidade-especificidade foi selecionado (círculo branco). Em C está representado o gráfico de comparação entre todas as curvas ROC para as proteínas ENV completas comerciais.

Tabela 6 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV comerciais completos.

Proteína	Sensibilidade	Especificidade	Cut-off	Área sob a curva	Erro padrão ^a	Interv.confiança 95% ^b
DENV1 ENV	84,7%	62.2%	>792	0.759	0.0371	0.693-0.817
DENV2 ENV	75.8%	78.4%	>683	0.801	0.0329	0.739-0.854
DENV2 ENV (MB)	69.6%	69.7%	>1350	0.7403	0.0370	0.669-0.803
DENV3 ENV	68.0%	79.5%	>776	0.776	0.0335	0.711-0.832
DENV4 ENV	74.2%	77.0%	>799	0.792	0.0321	0.729-0.846

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A tabela descreve o melhor par sensibilidade-especificidade para cada antígeno, além de mostrar o valor de *cut-off* estabelecido, a área sob a curva ROC, o erro padrão das análises e o intervalo de confiança para as proteínas completas DENV1-DENV4 da empresa Prospec e DENV2 da empresa MyBiosource (MB). ^a DeLong *et al.* (1988). ^b Binomial exata.

6.7.3.2 Proteínas ENV truncadas (domínios I/II) - MyBiosource

Para estabelecer uma comparação mais direta com as construções das proteínas DENV ENV truncadas deste trabalho, proteínas truncadas contendo apenas os domínios funcionais I e II da proteína completa DENV ENV foram adquiridas da empresa MyBiosource e testadas frente a um painel de soro de 178 amostras, dentre elas 112 amostras comprovadamente IgG positivas para dengue e 66 amostras negativas. Dentro do grupo das amostras negativas foram incluídas 18 amostras de pacientes vacinados contra febre amarela - IgG positivos para febre amarela.

Os ensaios para as proteínas DENV ENV truncadas (domínios I e II) comerciais foram realizados em sistema *multiplex* (quatro conjuntos de microesferas testados simultaneamente). As reações antígeno-anticorpo foram analisadas em termos de MFI, e os resultados foram submetidos à análise estatística através da curva ROC.

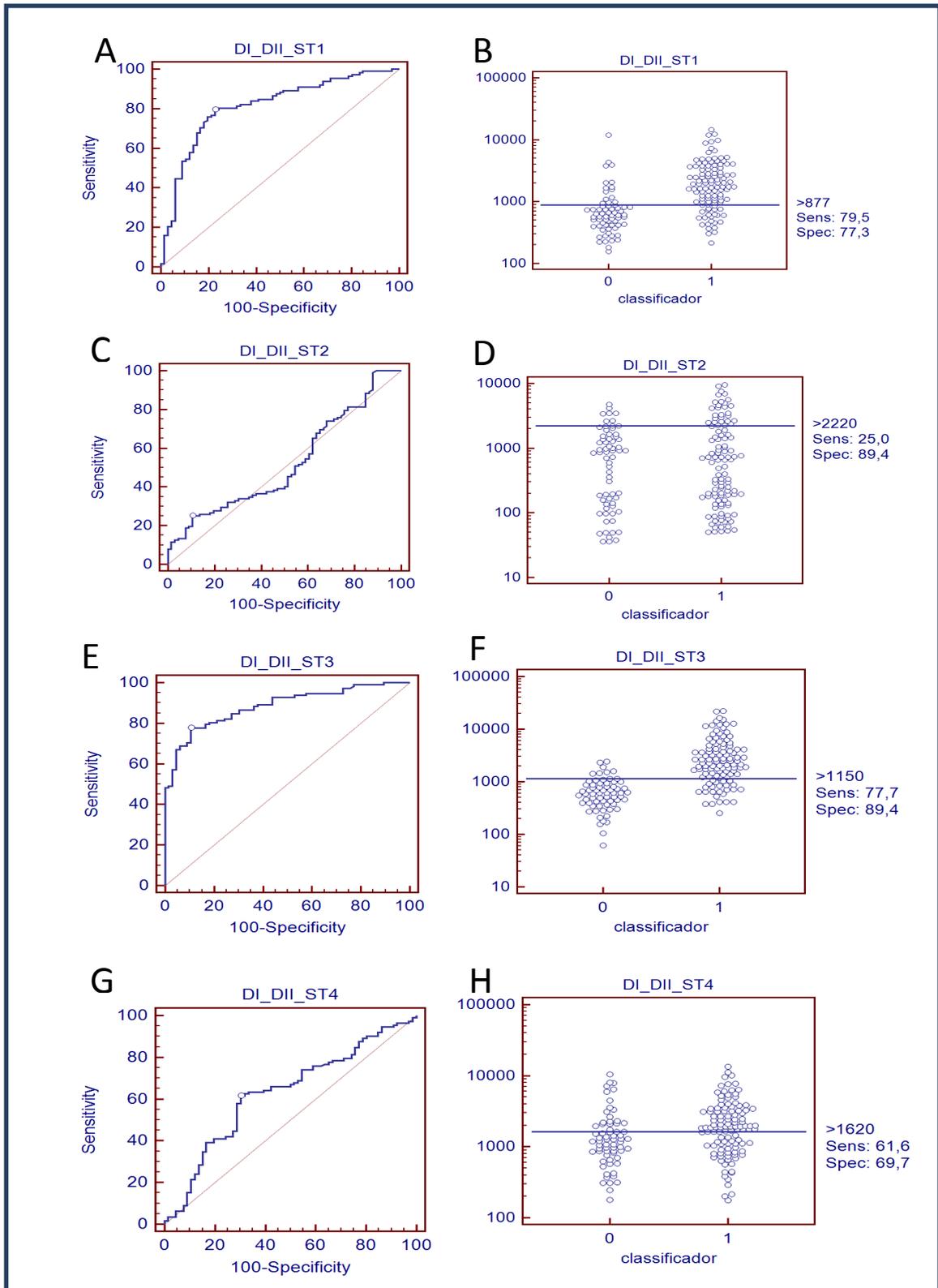
As proteínas DENV ENV truncadas sorotipos 1 e 3 apresentaram desempenho moderado na separação dos grupos de amostras positivos e negativos (par sensibilidade-especificidade de 79.5% e 77.3% para sorotipo 1 e 77.7% e 89.4% para o sorotipo 3. Porém os antígenos DENV ENV sorotipos 2 e 4 apresentaram um desempenho bastante inferior, de forma que os resultados obtidos com o teste diagnóstico não foram melhores que o acaso para classificar pacientes positivos e negativos. Isso pode ser visto pela proximidade da curva ROC

para cada antígeno com a linha diagonal pontilhada no gráfico das curvas ROC. A figura 59 e a tabela 7 resumizam os resultados estatisticamente obtidos.

Para confirmar tais achados, a figura 60 realiza a comparação entre as curvas ROC dos quatro antígenos testados, mostrando que DENV ENV sorotipo 3 obteve os melhores resultados de AUC (0.885), seguida por DENV ENV sorotipo 1 (0.813). Os valores de AUC para sorotipo 2 e sorotipo 4 ficaram em torno de 0.5 e 0.6, respectivamente, o que equivale a um teste diagnóstico de baixíssima acurácia e precisão.

Uma das causas envolvendo a menor sensibilidade e especificidade desses antígenos pode estar envolvido com o dobramento protéico (MAAS *et al.*, 2006). O desenovelamento e degradação de proteínas pode ser acelerado por um grande número de fatores ambientais, incluindo as alterações de proteínas, tais como glicosilação, desamidação e oxidação (BOUMA *et al.*, 2003; STEWART *et al.*, 2005; NILSSON e DOBSON, 2003), a interação de proteínas com superfícies, tais como a mica (ZHU *et al.*, 2002) ou fosfolipídeos carregados negativamente (ZHAO *et al.*, 2004). São ainda levados em conta condições tais como o aquecimento (RUIZ *et al.*, 2005), a liofilização (WANG, 2000), sonicação (STATHOPULOS *et al.*, 2004), empacotamento e embalagem para envio de materiais (RUIZ *et al.*, 2005), entre outros (FROKJAER; OTZEN, 2005).

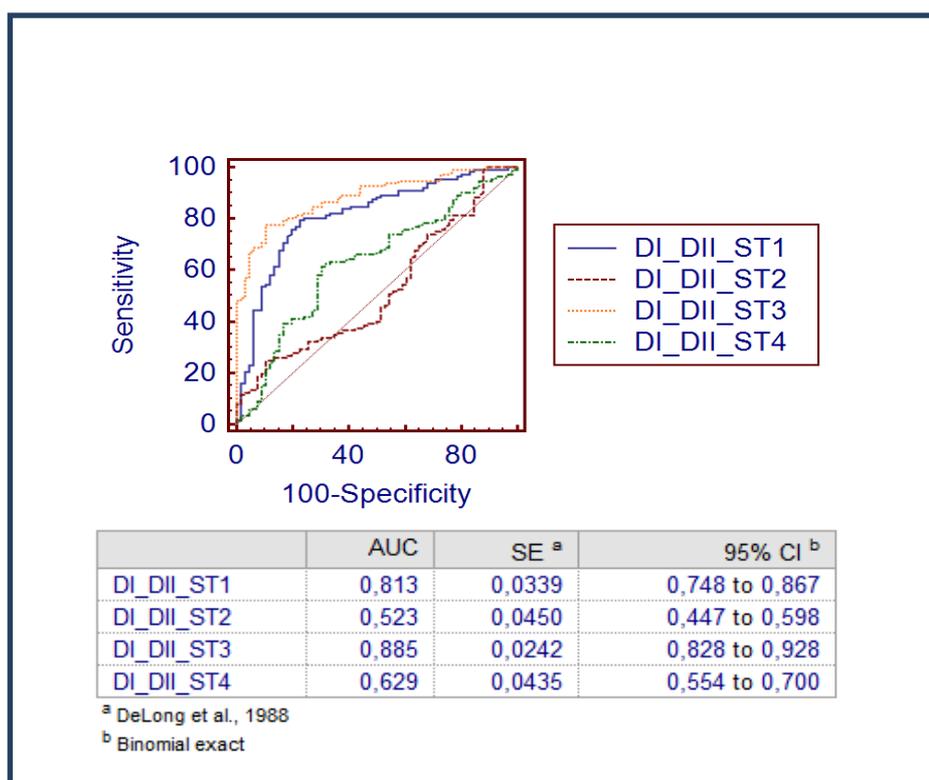
Figura 59 - Avaliação do desempenho dos antígenos DENV ENV (domínios I/II) através da curva ROC.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os antígenos foram testados contra 178 amostras, dentre elas 112 amostras comprovadamente IgG positivas para dengue e 66 amostras negativas. A capacidade dos antígenos em separar as populações de indivíduos controle (0) e indivíduos positivos para dengue (1), é mostrada nos diagramas de dispersão das amostras (B, D, F e H respectivamente para os sorotipos 1 a 4). Os dados foram submetidos à análise da curva ROC (A, C, E e G, respectivamente para os sorotipos 1 a 4), e os valores de *cut-off* para o melhor par sensibilidade-especificidade foram selecionados (círculo branco).

Figura 60 - Comparação entre as curvas ROC das proteínas DENV ENV (domínios I/II).



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A comparação direta das curvas mostra claramente o melhor desempenho dos antígenos sorotipo 1 e sorotipo 3 e a pouca acurácia dos testes envolvendo os sorotipos 2 e 4.

Tabela 7 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV (domínios I/II, MyBiosource).

Proteína DI/DII	Sensibilidade	Especificidade	Cut-off	Área sob a curva	Erro padrão ^a	Interv.confiança 95% ^b
DENV1	79.5%	77.5%	>877	0.813	0.0339	0.748-0.867
DENV2	25.0%	89.4%	>2220	0.523	0.0450	0.447-0.598
DENV3	77.7%	89.4%	>1150	0.885	0.0242	0.828-0.928
DENV4	61.6%	69.7%	>1620	0.629	0.0435	0.554-0.700

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A tabela descreve o melhor par sensibilidade-especificidade para cada antígeno, além de mostrar o valor de cut-off estabelecido, a área sob a curva ROC, o erro padrão das análises e o intervalo de confiança. Fonte: Dados da autora. ^a DeLong et al. (1988). ^b Binomial exata.

6.7.3.3 Proteínas ENV truncadas - domínio III (Prospec)

As proteínas DENV ENV truncadas contendo apenas o domínio funcional III da proteína completa foram adquiridas da empresa Prospec e avaliadas quanto a sua aplicação

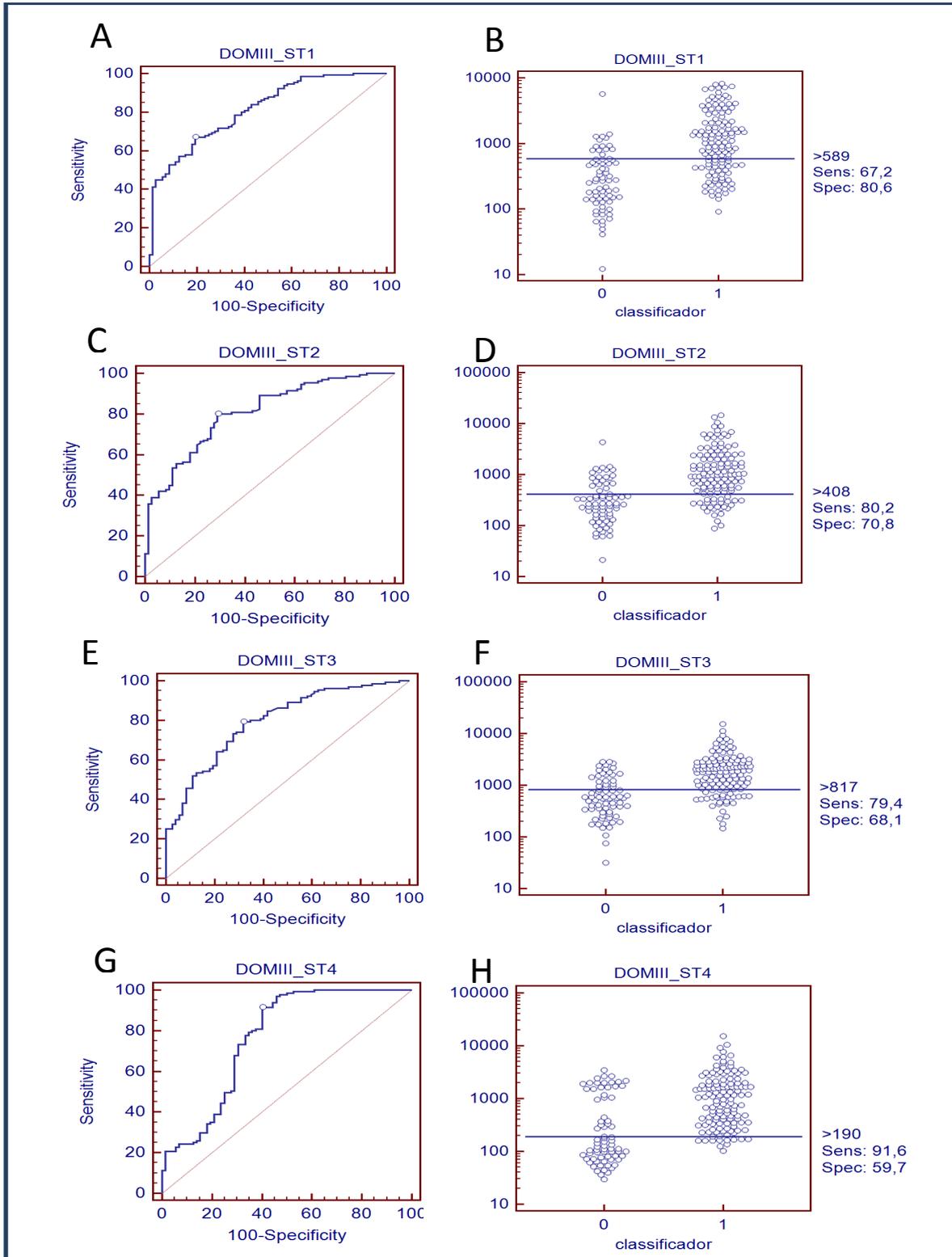
diagnóstica, em sistemas de microarranjos líquidos. Após o acoplamento, quatro conjuntos de microesferas foram testados em sistema *multiplex* frente a um painel de soro de 203 amostras, dentre elas 131 amostras comprovadamente IgG positivas para dengue e 72 amostras negativas. Dentre as amostras negativas, 21 eram de pacientes vacinados contra febre amarela - IgG positivos para febre amarela.

As reações antígeno-anticorpo foram analisadas em termos de MFI, e os resultados foram submetidos à análise estatística através da curva ROC. Todas as proteínas obtiveram um desempenho moderado na separação dos grupos de amostras positivos e negativos, com pares sensibilidade-especificidade de 67.2%-80% para sorotipo 1, 80.2%-70.8% para sorotipo 2, 79.4%-68.1% para sorotipo 3 e 91.6%-59.7 para a proteína do sorotipo 4. A figura 61 e a tabela 8 resumizam os resultados estatisticamente obtidos.

Através da análise concomitante de todas as curvas ROC (figura 62) podemos notar que o melhor valor de AUC obtido foi para a proteína sorotipo 1 (0.814) e o pior valor coube a proteína sorotipo 4 (0.766). De toda forma, o desempenho dos antígenos pode apenas ser considerado como razoável. É importante destacar que grande parte da literatura defende a expressão do domínio III da proteína ENV de dengue para fins de diagnóstico e imunizações, pela facilidade de expressão e grande valores de recuperação obtidos, além de importantes relatos que tratam o domínio III como altamente imunogênico em camundongos (BABU *et al.*, 2008; WAHALA *et al.*, 2010; ZULUETA *et al.*, 2006). Neste trabalho os valores obtidos de sensibilidade e especificidade obtidos para as proteínas DENV ENV truncadas domínios I e II foram sensivelmente melhores, e resultados equivalentes ou superiores aos das proteínas truncadas domínio III (utilizando os valores de AUC como padrão de comparação) foram obtidos com as proteínas truncadas domínio I e II dos sorotipos 1 e 3 (as demais proteínas sorotipo 2 e sorotipo 4 foram excluídas da análise por não terem se mostrado eficientes para aplicações diagnósticas, nas condições testadas).

Tais achados nos levam a pensar em que um número importante de epítomos imunogênicos gerados em condições reais de infecção podem estar sendo desconsiderados ao trabalhar apenas com o domínio III da proteína ENV, estratégia amplamente utilizada por diversos grupos de pesquisa.

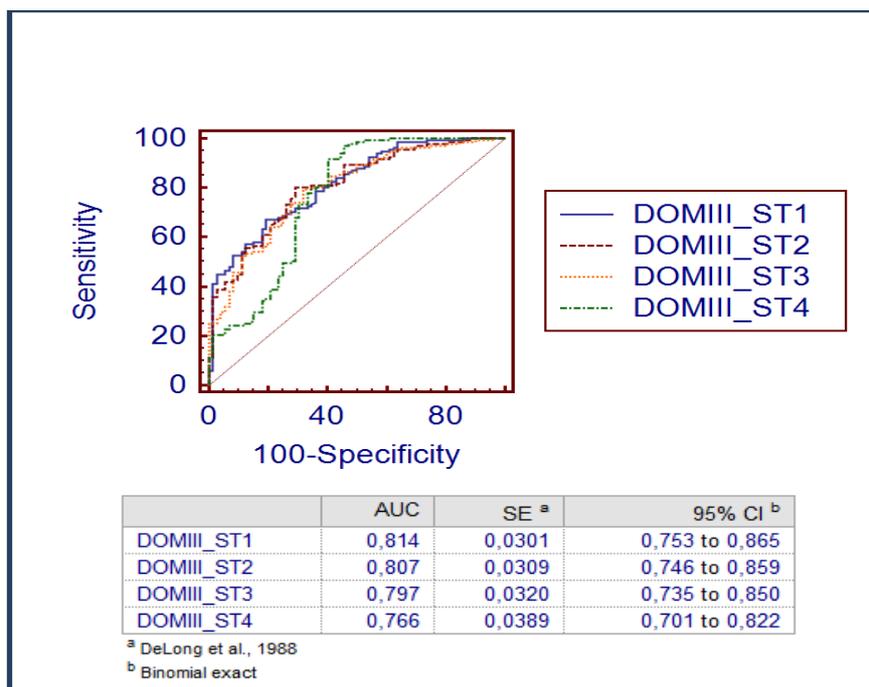
Figura 55 - Avaliação dos antígenos DENV ENV (domínio III) - Prospec, em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A MFI emitida pelo anticorpo de detecção foi utilizada para quantificar as reações. A capacidade de separação entre os grupos controle (0) e pacientes positivos (1) é mostrada no diagrama de dispersão em (B, D, F e G, respectivamente para os sorotipos 1 a 4). Os dados foram submetidos à análise da curva ROC (A, C, E e G, respectivamente para sorotipo 1 a 4), e os valores de *cut-off* para o melhor par sensibilidade-especificidade foram selecionados (círculo branco).

Figura 62 - Comparação entre as curvas ROC das proteínas DENV ENV domínio III - Prospec.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A comparação direta das curvas mostra claramente o melhor desempenho dos antígenos sorotipo 1 e sorotipo 2, embora todas as curvas tenham valores de AUC bastante similares. A proteína sorotipo 4 apresentou os piores resultados

Tabela 8 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV (domínio III) - Prospec.

Proteína DIII	Sensibilidade	Especificidade	Cut-off	Área sob a curva	Erro padrão ^a	Interv.confiança 95% ^b
DENV1	67.2%	80.6%	>589	0.814	0.0301	0.753-0.865
DENV2	80.2%	70.8%	>408	0.807	0.0309	0.746-0.859
DENV3	79.4%	68.1%	>817	0.797	0.0320	0.735-0.850
DENV4	91.6%	59.7%	>190	0.766	0.0389	0.701-0.822

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A tabela descreve o melhor par sensibilidade-especificidade para cada antígeno, além de mostrar o valor de *cut-off* estabelecido, a área sob a curva ROC, o erro padrão das análises e o intervalo de confiança. ^a DeLong et al. (1988). ^b Binomial exata.

6.7.3.4 Proteínas DENV ENV quiméricas (Prospec)

As proteínas ENV quiméricas comercializadas pela empresa Prospec são construções expressas em células *E. coli*. As proteínas DEN-005, DEN-007, DEN-008 e DEN-009 têm aproximadamente 22 kDa a 23 kDa e contém, de acordo com a empresa, as regiões imunodominantes presentes na região N-terminal dos sorotipos 1 a 4, respectivamente. A

empresa declara ainda que a região selecionada, para compor a sequência de cada sorotipo, contém uma região comum aos demais sorotipos.

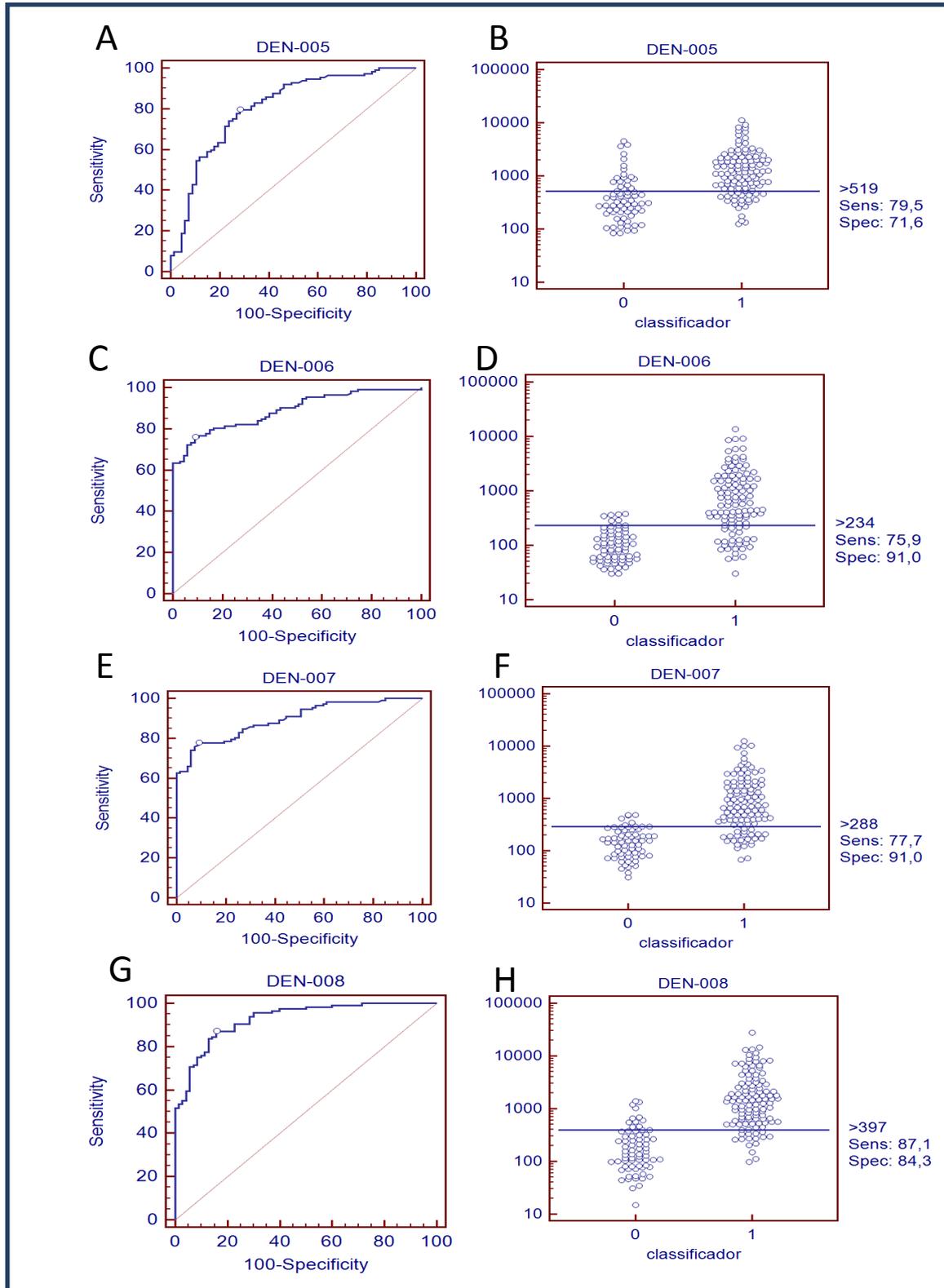
A proteína DEN-006 é uma construção de aproximadamente 12 kDa, derivada das regiões imunodominantes do domínio III de DENV ENV sorotipo 2. Por sua vez, a proteína DEN-010 é um antígeno polivalente de 22 kDa que contém os antígenos dos quatro sorotipos de DENV, produzidos em *E. coli* e fusionados com His. O antígeno polivalente é constituído por 25% do antígeno recombinante de cada um dos sorotipos de DENV na sua composição, sendo de acordo com a empresa capaz de detectar os quatro sorotipos virais.

Após o acoplamento, seis conjuntos de microesferas foram testados em sistema *multiplex* frente a um painel de soro de 179 amostras, dentre elas 112 amostras comprovadamente IgG positivas para dengue e 67 amostras negativas. Dentre as amostras negativas, 18 eram de pacientes vacinados contra febre amarela - IgG positivos para febre amarela.

As reações antígeno-anticorpo foram analisadas em termos de MFI, e os resultados foram submetidos à análise estatística através da curva ROC.

Os antígenos apresentaram um desempenho bastante variável entre si. De uma forma geral, o pior resultado foi obtido com a construção DEN-005 para o sorotipo 1, com valores de sensibilidade e especificidade 79.5% e 71.6%. Os demais antígenos se comportaram de maneira semelhante, o que pode ser visto nas figuras 63, 64 e 65. A sumarização de todos os valores obtidos de sensibilidade, especificidade, *cut-off* e valores de AUC estão sumarizados na tabela 9.

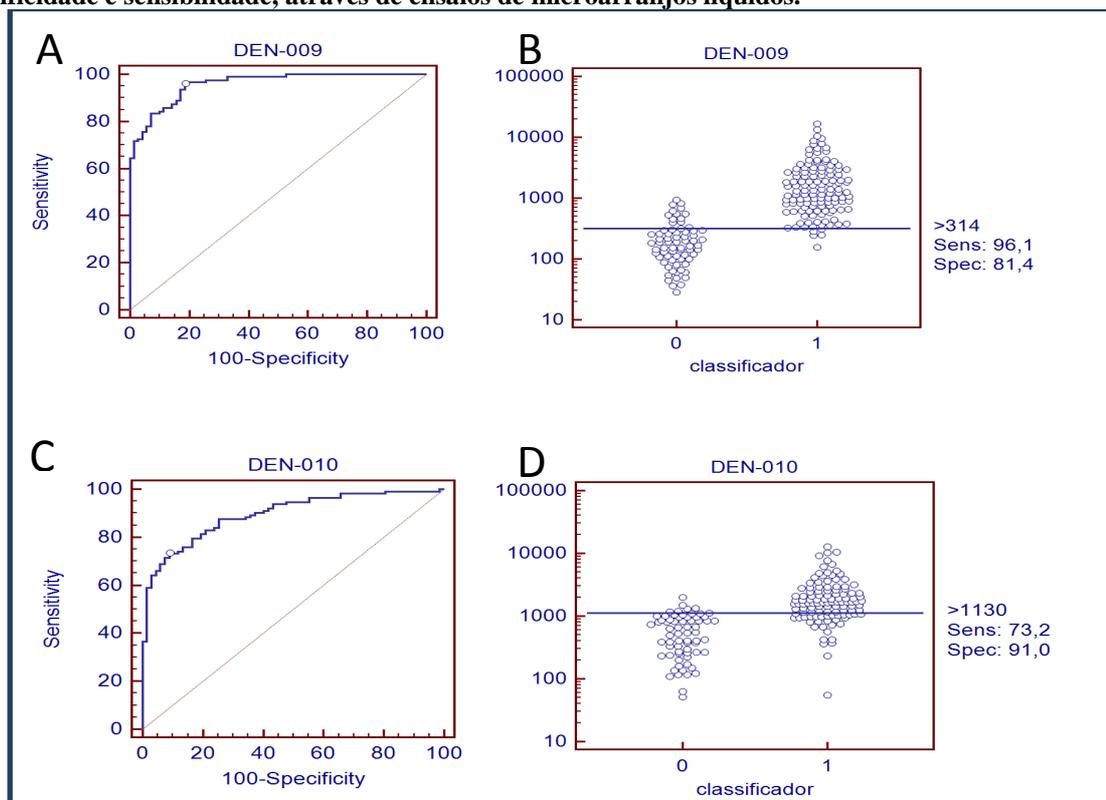
Figura 56 - Avaliação dos antígenos DENV ENV quiméricos – parte I (Prospec), em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A MFI emitida pelo anticorpo de detecção foi utilizada para quantificar as reações. A capacidade de separação entre os grupos controle (0) e pacientes positivos (1) é mostrada no diagrama de dispersão em (B, D, F e G, respectivamente para os sorotipos 1 a 4). Os dados foram submetidos à análise da curva ROC (A, C, E e G, respectivamente para sorotipos 1 a 4), e os valores de *cut-off* para o melhor par sensibilidade-especificidade foram selecionados (círculo branco).

Figura 57 - Avaliação dos antígenos DENV ENV quiméricos – parte II (Prospec), em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A MFI emitida pelo anticorpo de detecção foi utilizada para quantificar as reações. A capacidade de separação entre os grupos controle (0) e pacientes positivos (1) é mostrada no diagrama de dispersão em (B e D, respectivamente para os DEN-009 e DEN-010). Os dados foram submetidos à análise da curva ROC (A e C, respectivamente para DEN-009 e DEN-010), e os valores de *cut-off* para o melhor par sensibilidade-especificidade foram selecionados (círculo branco).

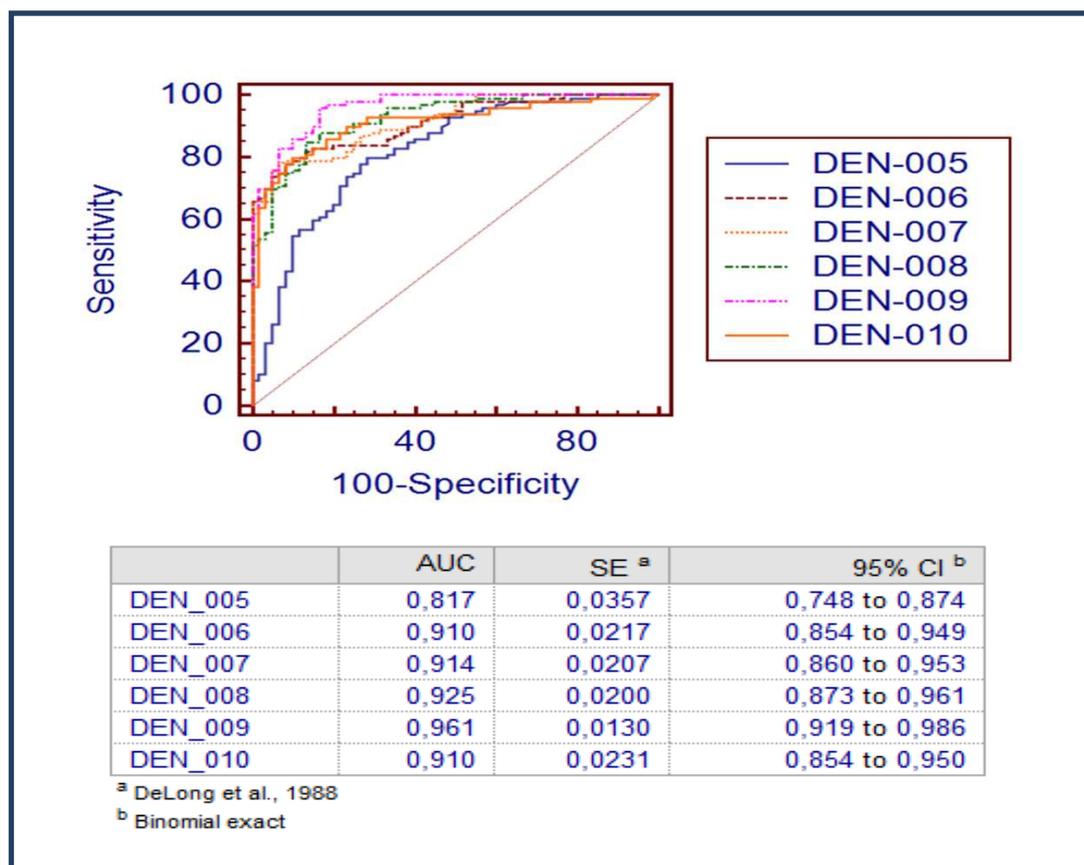
Tabela 9 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV quiméricos.

Proteína	Sensibilidade	Especificidade	<i>Cut-off</i>	Área sob a curva	Erro padrão ^a	Interv.confiança 95% ^b
DEN-005	79.5%	71.6%	>519	0.808	0.0349	0.743-0.863
DEN-006	75.9%	91.0%	>234	0.889	0.0233	0.834-0.931
DEN-007	77.7%	91%	>228	0.896	0.0224	0.841-0.936
DEN-008	87.1%	84.3%	>397	0.926	0.0184	0.879-0.959
DEN-009	96.1%	81.4%	>314	0.959	0.0120	0.922-0.982
DEN-010	73.2%	91.0%	>1130	0.895	0.0231	0.841-0.936

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A tabela descreve o melhor par sensibilidade-especificidade para cada antígeno, além de mostrar o valor de *cut-off* estabelecido, a área sob a curva ROC, o erro padrão das análises e o intervalo de confiança. ^a DeLong *et al.* (1988). ^b Binomial exata.

Figura 58 - Comparação entre as curvas ROC das proteínas DENV ENV quiméricas.

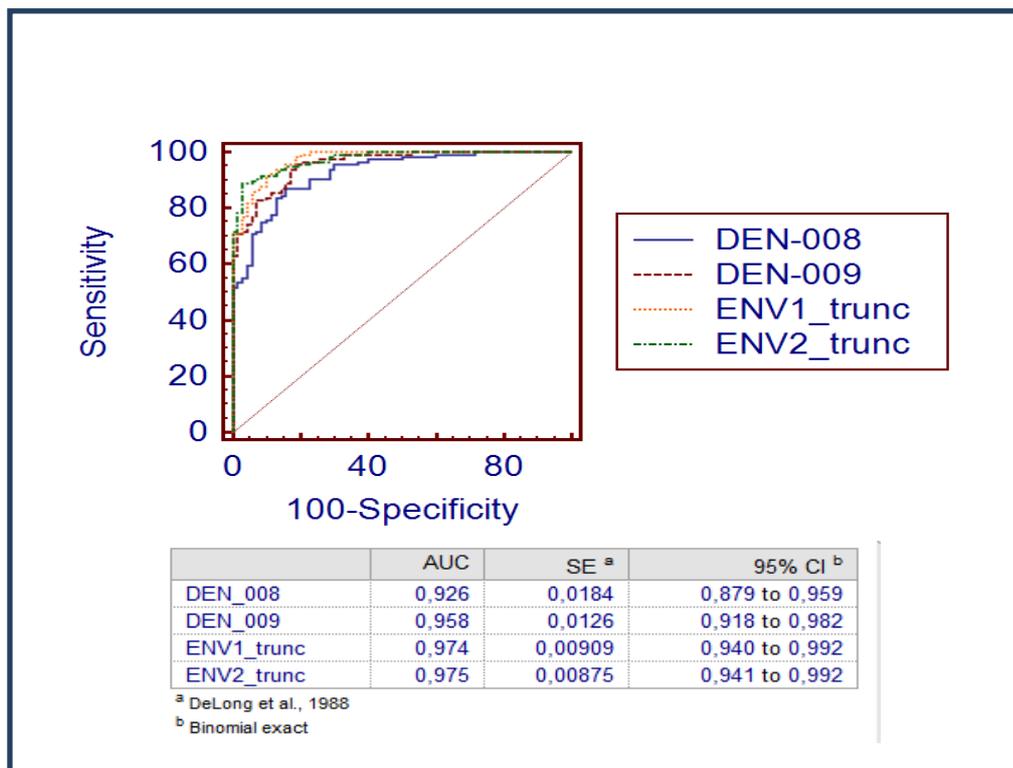


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A comparação direta das curvas mostra claramente um desempenho bastante variável entre os antígenos, que de uma forma geral comportam-se satisfatoriamente para separar as populações positivas e negativas, com altos valores de AUC em todos os casos.

Mediante os ótimos resultados das proteínas DEN-008 e DEN-009 (sorotipo 3 e sorotipo 4, respectivamente), com valores de AUC de 0.926 para DEN-008 e 0.959 para DEN-009, com bons valores de sensibilidade e especificidade para o cut-off selecionado, as mesmas foram selecionadas para compor o conjunto de proteínas para diagnóstico dos quatro sorotipos virais juntamente com DENV ENV truncada (domínio I e II) para os sorotipos 1 e 2. A comparação da curva ROC das quatro proteínas é mostrada na figura 66, e traduz a alta acurácia dos testes diagnósticos utilizando as proteínas em sistema *multiplex*.

Figura 66 - Comparação entre as curvas ROC das proteínas DENV ENV quiméricas DEN-009 e DEN-010 com as proteínas DENV ENV (domínios I/II) *in house*, sorotipos 1 e 2.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A comparação direta das curvas mostra claramente o excelente desempenho dos quatro antígenos DENV1 ENV domínios I/II (ENV1_trunc), DENV2 ENV domínios I/II (ENV2_trunc), DENV3 (DEN-008) e DENV4 (DEN-009) (aplicados à metodologia de microarranjos líquidos, com todos apresentando altos valores de AUC).

Essa combinação de antígenos (que chamaremos de ENV_tetravalente), juntamente com as proteínas NS1 renaturadas pela metodologia NS1-rec, se mostraram igualmente eficientes para o diagnóstico de dengue pela metodologia de microarranjos líquidos. Fica em destaque a facilidade de aplicar os antígenos de DENV ENV pelos altos níveis de recuperação protéica a partir da expressão e purificação, além de a etapa de renaturação protéica não ter se mostrado necessária para alcançar resultados satisfatórios de sensibilidade e especificidade.

6.7.4 Microesferas tetravalentes

Para avaliar se, ao invés de usar quatro conjuntos de microesferas para cada análise, poderíamos acoplar em um único conjunto as quatro proteínas de interesse para cada sorotipo, e assim realizar uma análise mais rápida para infecção por DENV, independente do sorotipo infectante (uma situação com largas possibilidades de aplicação em condições de epidemia),

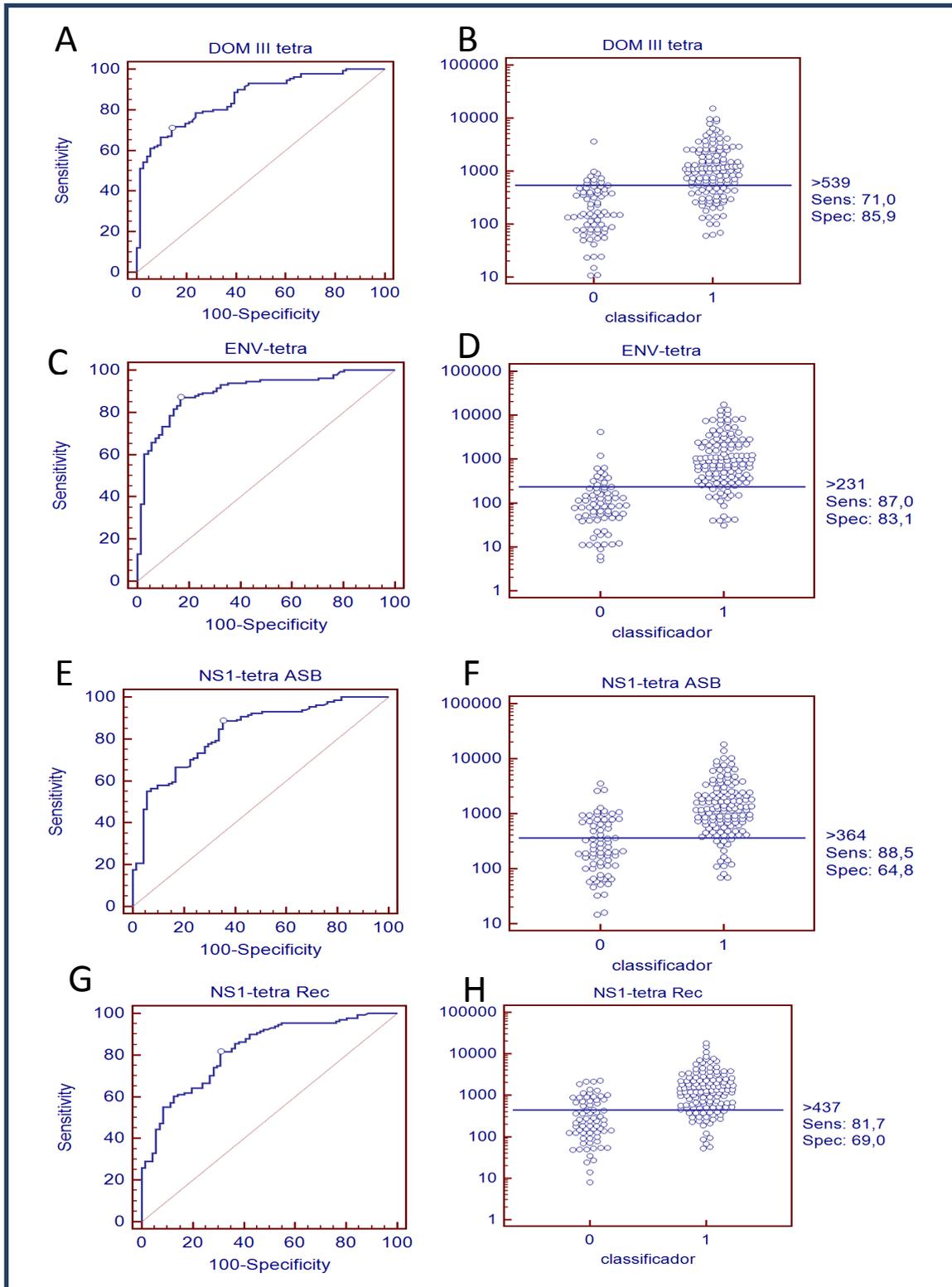
testamos acoplar as quatro proteínas (uma de cada sorotipo) para NS1-ASB, NS1-rec, DENV ENV truncada (domínio III) e ENV_tetravalente.

Após o acoplamento, os quatro conjuntos tetravalentes de microesferas foram testados em sistema *multiplex* frente a um painel de soro de 202 amostras, dentre elas 131 amostras comprovadamente IgG positivas para dengue e 71 amostras negativas. Dentre as amostras negativas, 21 eram de pacientes vacinados contra febre amarela - IgG positivos para febre amarela.

As reações antígeno-anticorpo foram analisadas em termos de MFI, e os resultados foram submetidos à análise estatística através da curva ROC.

Os antígenos apresentaram um desempenho bastante variável entre si. As proteínas NS1-ASB e NS1-rec comportaram-se de uma forma bastante similar entre si, com quase nenhuma diferença nos valores de AUC para NS1-ASB, e com queda no desempenho das proteínas NS1-rec. As proteínas DENV ENV truncadas (domínio III) apresentaram resultados bastante comparáveis à análise das proteínas individualmente, com par sensibilidade e especificidade de 71% e 85,9%, respectivamente. O melhor resultado foi obtido com ENV_tetravalente, com sensibilidade de 87%, especificidade de 83,1% e valor de AUC de 0.899. Embora seja um resultado excelente, foi inferior ao obtido com as construções individualmente. As figuras 67 e 68 mostram as curvas ROC obtidas, os gráficos de dispersão das amostras e a comparação das curvas ROC entre si. A sumarização de todos os valores obtidos de sensibilidade, especificidade, *cut-off* e valores de AUC estão sumarizados na tabela 10.

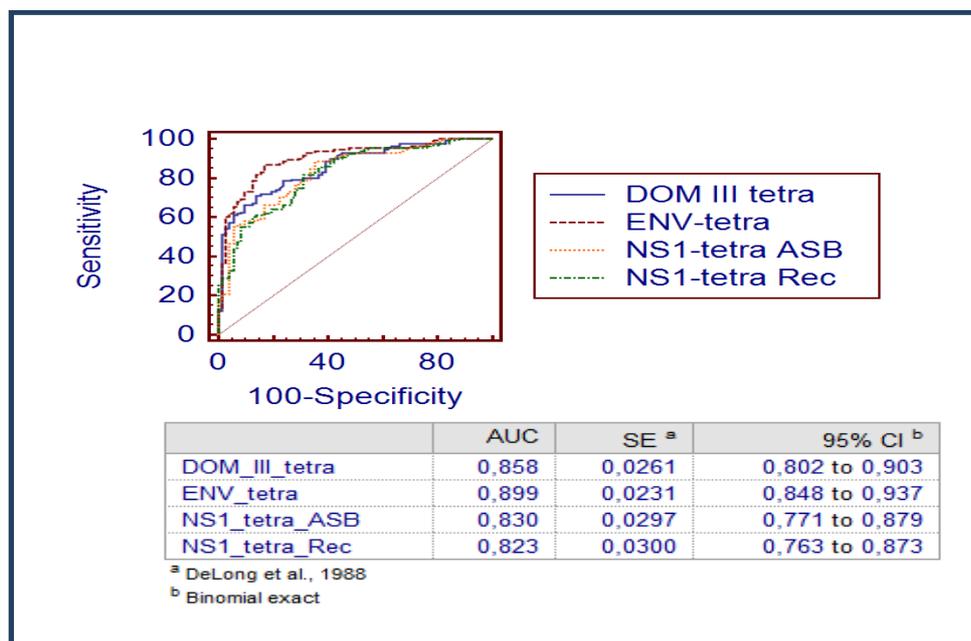
Figura 67 - Avaliação dos antígenos DENV, ENV e NS1, em microesferas tetravalentes, em termos de especificidade e sensibilidade, através de ensaios de microarranjos líquidos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A MFI emitida pelo anticorpo de detecção foi utilizada para quantificar as reações. A capacidade de separação entre os grupos controle (0) e pacientes positivos (1) é mostrada no diagrama de dispersão em (B, D, F e H, respectivamente para os sorotipos 1 a 4). Os dados foram submetidos à análise da curva ROC (A, C, E e G, respectivamente para os sorotipos 1 a 4), e os valores de *cut-off* para o melhor par sensibilidade-especificidade foram selecionados (círculo branco).

Figura 68 - Comparação entre as curvas ROC dos antígenos DENV, ENV e NS1, acoplados às beads tetravalentes.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A comparação direta das curvas mostra que todos as beads tetravalentes tiveram um bom resultado de sensibilidade e especificidade, com valores de AUC sempre acima de 0.8. O melhor resultado foi obtido com a composição ENV tetravalente. Fonte: Dados da autora.

Tabela 10 - Análise estatística da validação dos antígenos DENV ENV e NS1 em microesferas tetravalentes (tetra).

Proteína	Sensibilidade	Especificidade	Cut-off	Área sob a curva	Erro padrão ^a	Interv.confiança 95% ^b
domIII tetra	71.0%	85.95%	>539	0.858	0.0261	0.802-0.903
ENV tetra	87.0%	83.1%	>231	0.899	0.0231	0.848-0.937
NS1-ASB tetra	88.5%	64.8%	>364	0.830	0.0297	0.771-0.879
NS1-rec btetra	81.7%	69.0%	>437	0.823	0.03	0.763-0.873

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A tabela descreve o melhor par sensibilidade-especificidade para cada antígeno, além de mostrar o valor de *cut-off* estabelecido, a área sob a curva ROC, o erro padrão das análises e o intervalo de confiança. Fonte: Dados da autora. ^a DeLong *et al.* (1988). ^b Binomial exata.

6.8 Classificadores

A tabela 11 sumariza todos os dados discutidos nas sessões anteriores:

Tabela 11 - Análise estatística da performance dos antígenos produzidos neste trabalho e adquiridos comercialmente em ensaios de microarranjos líquidos.

Proteína	Sensibili- dade	Especi- ficidade	Cut-off	AUC	EP ^a	IC 95% ^b
DENV1 rec	87.3%	93.1%	>1190	0.953	0.0143	0.911-0.979
DENV2 rec	88.1%	91.4%	>831	0.947	0.0170	0.905-0.975
DENV3 rec	84.9%	93.1%	>1050	0.943	0.0181	0.899-0.972
DENV4 rec	79.4%	96.6%	>1220	0.939	0.0179	0.894-0.969
DENV1 ASB	77.0%	82.8%	>352.5	0.849	0.0293	0.789-0.897
DENV2 ASB	84.1%	79.3%	>180	0.876	0.0259	0.819-0.920
DENV3 ASB	77%	87.9%	>650	0.886	0.0266	0.831-0.928
DENV4 ASB	94.2%	67.2%	>392	0.898	0.0230	0.845-0.937
DENV1 Trunc ENV	92.1%	90.0%	>307	0.976	0.00837	0.944-0.993
DENV2 Trunc ENV	89.8%	97.1%	>495	0.977	0.00815	0.945-0.993
DENV1 ENV (Prospec)	84,7%	62.2%	>792	0.759	0.0371	0.693-0.817
DENV2 ENV (Prospec)	75.8%	78.4%	>683	0.801	0.0329	0.739-0.854
DENV2 ENV (MB)	69.6%	69.7%	>1350	0.7403	0.0370	0.669-0.803
DENV3 ENV (Prospec)	68.0%	79.5%	>776	0.776	0.0335	0.711-0.832
DENV4 ENV(Prospec)	74.2%	77.0%	>799	0.792	0.0321	0.729-0.846
DENV1 DI/DII	79.5%	77.5%	>877	0.813	0.0339	0.748-0.867
DENV2 DI/DII	25.0%	89.4%	>2220	0.523	0.0450	0.447-0.598
DENV3 DI/DII	77.7%	89.4%	>1150	0.885	0.0242	0.828-0.928
DENV4 DI/DII	61.6%	69.7%	>1620	0.629	0.0435	0.554-0.700
DENV1 DIII	67.2%	80.6%	>589	0.814	0.0301	0.753-0.865
DENV2 DIII	80.2%	70.8%	>408	0.807	0.0309	0.746-0.859
DENV3 DIII	79.4%	68.1%	>817	0.797	0.0320	0.735-0.850
DENV4 DIII	91.6%	59.7%	>190	0.766	0.0389	0.701-0.822
DEN-005	79.5%	71.6%	>519	0.808	0.0349	0.743-0.863
DEN-006	75.9%	91.0%	>234	0.889	0.0233	0.834-0.931
DEN-007	77.7%	91%	>228	0.896	0.0224	0.841-0.936
DEN-008	87.1%	84.3%	>397	0.926	0.0184	0.879-0.959
DEN-009	96.1%	81.4%	>314	0.959	0.0120	0.922-0.982
DEN-010	73.2%	91.0%	>1130	0.895	0.0231	0.841-0.936

Uma abordagem interessante envolve o estabelecimento de um critério de classificação para as amostras em ensaios *multiplex*, analisando os antígenos simultaneamente, de forma que, quando a amostra apresenta valores de MFI acima do valor

de *cut-off* para qualquer um dos antígenos individuais inseridos na análise, ela é classificada como positiva. Esta é uma maneira de tentar aumentar os níveis de sensibilidade dos ensaios.

Foram estabelecidos quatro grupos: DENV1 e DENV2 ENV truncada (domínios I/II); DEN-008 E DEN-009; ENV tetravalente (quatro proteínas); NS1-rec (quatro proteínas); e por fim DENV2 ENV e DENV1 NS1. Os resultados de sensibilidade e especificidade analisados por grupos de proteínas analisadas simultaneamente estão descritos na tabela 12.

Tabela 12 - Análise estatística para estabelecimento de classificadores, por grupos de proteínas analisadas simultaneamente.

	Sensibilidade	Especificidade	IC 95%
DENV1 / DENV2 ENV trunc	0.984252	0.928571	0.938-0.997 0.834-0.973
DEN-008 / DEN-009	0.984252	0.828571	0.938-0.997 0.715-0.904
ENV tetravalente	0.992126	0.828571	0.950-0.999 0.715-0.90
NS1-rec	0.920635	0.827586	0.855-0.959 0.701-0.909
DENV2 ENV/DENV1 NS1	0.984	0.920635	0.937-0.992 0.817-0.970

De acordo com os resultados obtidos, as proteínas DENV1/DENV2 ENV trunc mantiveram o bom desempenho anteriormente obtido, com um aumento de sensibilidade para 98% e de especificidade para 92%. Os mesmos valores foram obtidos com a combinação entre as proteínas ENV e NS1 com os melhores resultados obtidos em análise individual, DENV2 ENV e DENV1 NS1. ENV tetravalente, apesar de obter 99% de sensibilidade, apresentou uma queda na especificidade, quando comparada com as demais combinações, e o mesmo acontece com NS1-rec e DEN-008/DEN-009.

7 Conclusões e perspectivas

- a) A otimização das sequências gênicas virais resultou em níveis elevados de expressão de proteína, como corpos de inclusão, em sistema de expressão procariótico. Os maiores níveis de expressão obtidos foram: para as proteínas ENV, DENV2 ENV truncado, e para as proteínas NS1, DENV NS1 sorotipo 1.
- b) Ambos os métodos de renaturação (NS1-rec e NS1-ASB) foram bem sucedidos. O método NS1-rec, no entanto, apresenta um maior potencial comercial, apresentando uma maior recuperação de proteína e gerando proteínas com melhorada capacidade de reconhecer anticorpos anti-DENV em amostras de soro ou plasma.
- c) As proteínas truncadas DENV ENV sorotipo 1 e 2 apresentaram o melhor desempenho entre todas as proteínas testadas neste trabalho. Esses antígenos são considerados a melhor opção para aplicação comercial, pois além da excelente precisão dos testes, eles não requerem o processo de renaturação exigido pelas proteínas NS1.
- d) O anti-soro de coelho anti-dengue NS1 tetravalente produzido, demonstrou ser útil para aplicações diferentes, tais como imunofluorescência, ELISA (NS1 de captura de antígeno) e citometria de fluxo. Uma abordagem interessante envolve adaptar a técnica de ELISA de captura para o sistema de microarranjos líquidos.
- e) A produção de outros anticorpos anti-dengue NS1, utilizando um hospedeiro diferente (como camudongo), irá contribuir para um ensaio quantitativo totalmente desenvolvido pelo nosso grupo, independente de insumos comerciais.
- f) Acreditamos que a sensibilidade e a especificidade dos antígenos produzidos podem ser consideravelmente melhoradas se técnicas mais precisas de purificação de proteínas forem aplicadas, tais como HPLC.
- g) Os resultados inferiores obtidos com os antígenos comerciais, entre outros fatores, destacam a importância da escolha de sequências de vírus isolados no Brasil e América do Sul para a construção de nossas sequências, o que contribuiu consideravelmente para a melhoria do desempenho dos antígenos produzidos neste trabalho, com a coorte estudada. A coorte estudada não possuía amostras positivas para DENV4, por isso o estudo da resposta dos antígenos a soros sorotipo-específicos poderá ajudar a esclarecer o nível de reação cruzada existente entre os antígenos testados, e justificar possíveis resultados inferiores obtidos por proteínas cujos sorotipos não eram frequentes na população estudada.

Referências

- ADANG, M. J., *et al.* The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIII_A gene in protoplasts and potato plants. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 21, n. 6, p. 1131-1145, 1993.
- ALCON, S., *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 376–381, 2001.
- ALLONSO, D., *et al.* Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 175, n. 1, p. 109–116, 2011.
- ALVAREZ, D. E. *et al.* Structural and functional analysis of dengue virus RNA. **Novartis Foundation Symposium**, Chichester, v. 277, p. 120-132, 2006.
- AMORIM, J. H., *et al.* Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 167, n. 2, p. 186-192, 2010.
- ARAÚJO, M. R. T. **Expressão de proteínas recombinantes de vírus do gênero *Flavivirus*: Aplicação no desenvolvimento de kits de diagnóstico e em estratégias antivirais.** 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- AUEWARAKUL, P. Composition bias and genome polarity of RNA viruses. **Virus Research**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 33-37, 2005.
- BABU, J. P., *et al.* Immunogenicity of a recombinant envelope domain III protein of dengue virus type-4 with various adjuvants in mice. **Vaccine**, Guildford, v. 26, n. 36, p. 4655-4663, 2008.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 10, n. 5, p. 411-421, 1999.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, n. 64, 2008.
- BATEMAN, J. M.; PURTON, S. Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: expression vectors and a new dominant selectable marker. **Molecular Genetics and Genomics**, New York, v. 263, n. 3, p. 404-410, 2000.

BATRA, G., *et al.* *Pichia pastoris*-expressed dengue virus type 2 envelope domain III elicits virus-neutralizing antibodies. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 10-16, 2010.

BESSOFF, K., *et al.* Comparison of Two Commercially Available Dengue Virus (DENV) NS1 Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using a Single Clinical Sample for Diagnosis of Acute DENV Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 15 n. 10, p. 1513-1518, 2008.

BESSOFF, K., *et al.* Utility of a Commercial Nonstructural Protein 1 Antigen Capture Kit as a Dengue Virus Diagnostic Tool. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 17, p. 6949-6953, 2010.

BIAGINI, R. E., *et al.* Comparison of a multiplexed fluorescent covalent microsphere immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n. 1, p. 50-55, 2004.

BISHT, H., *et al.* Expression and purification of Dengue virus type 2 envelope protein as a fusion with hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 23, n. 1, p. 84-96, 2001.

BITTER, G. A.; EGAN, K. W. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. **Gene**, Amsterdam, v. 32, p. 263-274, 1984.

BORNERT, O., *et al.* Overexpression of Membrane Proteins Using *Pichia pastoris*. **Current Protocols in Protein Science**, Hoboken, v. 29, n. 2, 2012.

BOUMA, B., *et al.* **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 41810–41819, 2003.

BRAGA, A. C. S. **Curvas ROC: Aspectos funcionais e aplicações**. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade do Minho, Minho, 2003.

BRANCH, S. L.; LEVETT, P. N. Evaluation of Four Methods for Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Dengue Virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 6, n. 4, p. 555–557, 1999.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6 ed. Brasília, 2005. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Lista de unidades federadas por município e área de risco para febre amarela silvestre Brasil – 2003**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/fa_mun_risco.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. 3 ed. Brasília, 2007. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue - Informações Técnicas**. Brasília, 2009. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31125>. Acesso em: 26 set. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tópicos de Saúde – D. Dengue**. Brasília, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22207>. Acesso em: 24 abr. 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Balanco Dengue: Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf> Acesso em: 15 jan 2012.

BRASIL, 2012. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Entomologia**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kkitdengue/epidemiologia/textos/mapa/entomologia.pdf>> Acesso em: 11 jan. 2012.

BRILLET, K.; PEREIRA, C. A.; WAGNER, R. Expression of membrane proteins in *Drosophila Melanogaster* S2 cells: Production and analysis of a EGFP-fused G protein-coupled receptor as a model. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 601, p.119-133, 2010.

BRINKMANN, U.; MATTES, R. E.; BUCKEL, P. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the DNA Y gene product. **Gene**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p.109-114, 1989.

BUCHY, P.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Laboratory Tests For The Diagnosis Of Dengue Virus Infection. Scientific Working Group, Report on Dengue, Geneva, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_dengue_2.htm> Acesso em: 10 jan. 2012.

BURGESS-BROWN, N. A., *et al.* Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 59, p. 94–102, 2008.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. *et al.* (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: 5 ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2001.

CÂMARA, F. P., *et al.* Regional and dynamics characteristics of dengue in Brazil: a retrospective study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 2, p. 192-196, 2007.

CARMO, A. C. V., *et al.* Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. **Antiviral Research**, Amsterdam, 2012. No prelo.

CARSTENS, C. P., *et al.* BL21-Codon Plus Cells correct expression problems caused by codon bias. **Strategies**, La Jolla, v. 14, p.50-52, 2001.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL (Estados Unidos). **Dengue Fever**. Atlanta, 2007. Disponível em: <<http://www.Centers for Diseases Control.gov/ncidod/dvbid/dengue/>>. Acesso em: 16 nov. 2009.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL (Estados Unidos). **Laboratory Guidance and Diagnostic Testing**. Atlanta, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dengue/clinicalLab/laboratory.html>>. Acesso em: 25 mar. 2012.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL (Estados Unidos). **Division of vector-borne infectious diseases**. Atlanta, 2011. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue /index.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm)>. Acesso em 1 maio 2011.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL (Estados Unidos). **Entomology**. 2012a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dengue/entomology Ecology/index.html>>. Acesso em: 04 jan. 2012.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL (Estados Unidos). **Dengue**. 2012b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue>>. Acesso em: 03 jan. 2012.

CHAMBERS, T. J., *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHANDLER, A. C.; RICE, L. Observations on the ethiology of dengue fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 3, n. 233, 1923.

CHEN, J., *et al.* A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. **Genome Research**, New York, v. 10, p. 549-557, 2000.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**. Oxford, 2011. No prelo.

CHIU, W. W.; KINNEY, R. M.; DREHER, T. W. Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 79, p. 8303-8315, 2005.

CLELAND, J. B.; BRADLEY, B.; MCDONALD, W. Further Experiments in the Etiology of Dengue Fever. **Journal of Hygiene**, London, v. 18, n. 217, 1919.

COHEN, S., *et al.* Expression of the envelope antigen of dengue virus in vaccine strains of Salmonella. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 7-8, p.855-858, 1990.

COHEN, A. L., *et al.* Rapid diagnostic tests for dengue and leptospirosis: antibody detection is insensitive at presentation. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 47-51, 2007.

COLLINS, S. W.; PORTERFIELD, J. S. pH-dependent fusion between the *flavivirus West Nile* and liposomal model membranes. **Journal of General Virology**, London, v. 67, p. 157-166, 1986.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

COSTA, S. M., *et al.* DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. **Vaccine**, Guildford, v. 24, n. 21, p. 4562-4564, 2006.

COTTINGHAM, M. G.; CARROLL, F.; MORRIS, S. J. Preventing spontaneous genetic rearrangements in the transgene cassettes of adenovirus vectors. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 109, n. 3, p. 719-728, 2012.

CUNHA, R. V., *et al.* Infecção secundária por dengue em escolares numa região endêmica para o dengue no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 517-521, 1995.

DALLMANN, H. G.; DUNN, S. D. Translation through an uncDC mRNA Secondary Structure Governs the Level of uncC Expression in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, n. 5, p. 1242-1250, 1994.

DAS, D., *et al.* Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 66, n. 1, p. 66-72, 2009.

DELONG, E. R.; DELONG, D. M.; CLARKE-PEARSON, D. L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. **Biometrics**, Washington, v. 44, p. 837-845, 1988.

DONALÍSIO, M. R. **O dengue no espaço habitado**. São Paulo: Editora Humanismo, Ciência e Tecnologia, 1999.

DONG, H.; NILSSON, L.; KURLAND, C. G. Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 260, n. 5, p. 649-663, 1996.

DOUGLAS, D.; WICHMANN, O.; DEROECK, D. **The perceived need for dengue vaccine in dengue endemic countries**. Trabalho apresentado no 3rd Vaccine Global Congress, em 2009, Singapore, 2009.

DUNBAR, S. A., *et al.* Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 245-252, 2003.

DUNBAR, S. A. Applications of LuminexR xMAP[®] technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 363, n. 2006, p. 71-82, 2005.

DURET, L. tRNA gene number and codon usage in the *C. elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 16, n.7, p. 287-289, 2000.

DUSSART, P., *et al.* Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 13, n. 11, p.1185-1189, 2006.

EDELMAN, R., *et al.* Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 69, p. 48-60, 2003.

ENDY, T. P., *et al.* Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 156, n. 1, p. 40-51, 2002.

FALGOUT, B.; MARKOFF, L. Evidence that *Flavivirus* NS1-NS2A Cleavage Is Mediated by a Membrane-Bound Host Protease in the Endoplasmic Reticulum. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 69, n. 11, p. 7232-7243, 1995.

FALGOUT, B.; CHANOCK, R.; LAI, C. J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2A. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 63, p. 1852-1860, 1989.

FALGOUT, B., *et al.* Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 65, p. 2467-2475, 1991.

FLAMAND, M. *et al.* Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosilation-dependent fashion. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 73, n. 7, 1999.

FROKJAER, S.; OTZEN, D. E. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 4, p. 298–306, 2005.

FRY, S. R., *et al.* The Diagnostic Sensitivity of Dengue Rapid Test Assays Is Significantly Enhanced by Using a Combined Antigen and Antibody Testing Approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. e1199, 2011.

FUHRMANN, M.; OERTEL, W.; HEGEMANN, P. A synthetic genecoding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Journal**, Oxford, v. 19, p. 353-361, 1999.

FULTON, R. J.; MCDADE, R. L.; SMITH, P. L. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. **Clinical Chemistry**, Edinburgh, v. 43, p. 1749–1756, 1997.

GALTIER, N., *et al.* GC-content evolution in mammalian genomes: the biased gene conversion hypothesis. **Genetics**, Baltimore, v. 159, p. 907–911, 2001.

GASTEIGER, E., *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa: Humana Press, 2005.

GUBLER, D. J.; MELTZER, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Advances in Virus Research**, New York, v. 53, p. 35-70, 1999.

GOLDMAN, E., *et al.* Consecutive low usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 245, p. 467-473, 1995.

GRABAREK, Z.; GERGELY, J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 185, p. 131-135, 1990.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. **Biochemistry**, Washington, v. 8, n. 10, 1973.

GREENFIELD, N. J. Analysis of Circular Dichroism Data. In: JOHNSON, M. L.; BRAND, L. (Ed.). **Methods in Enzymology**, Numerical Computer Methods, Part D. New York: Elsevier Science, 2004.

GRISWOLD, K. E., *et al.* Effects of codon usage versus putative 5'-mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 27, n. 1, p. 134-142, 2003.

GROTE, A., *et al.* JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. W526–W531, 2005.

GUBLER, D. J. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* borne disease control in the 1990s: Top down or bottom up. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 40, p. 571-578, 1989.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: Its history and resurgence as a global health problem. In: Gubler, D. J.; Kuno, G. (Ed.). **Dengue and Dengue and Hemorrhagic Fever**. p. 1-22. 1997.

GUBLER, D. J. The global resurgence of arboviral diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 90, p. 449–451, 1996.

GUIRAKHOO, F., *et al.* Construction, Safety, and Immunogenicity in Nonhuman Primates of a Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 75, n. 16, p. 7290-7304, 2001.

GUPTA, K.; HOOTON, T. M.; STAMM, W. E. Increasing antimicrobial resistance and the managements of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 135, p. 41–50, 2001.

GURVICH, O. L., *et al.* Expression levels influence ribosomal frameshifting at the tandem rare arginine codons AGG_AGG and AGA_AGA in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 187, n. 12, p. 4023-4032, 2005.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends in Biotechnology**, Barking, v. 22, p. 346–353, 2004.

GUY, B. Immunogenicity of sanofi pasteur tetravalent dengue vaccine. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. S16-19, 2009.

GUZMÁN, M. G. Avances para la obtención de una vacunas contra el dengue/Advances in the development of a vaccine against dengue. **Acta Científica Venezolana**, Caracas, v. 49, n. 1, p. 38-45, 1998.

GUZMÁN, M.G.; KOURÍ, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, p.33-42, 2002.

GUZMÁN, M. G., *et al.* Quality control of the serological diagnosis of dengue in laboratories throughout the Americas, 1996-2001. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 14, n. 6, p. 371-376, 2003.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

GUZMÁN, M. G.; VAZQUEZ, S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Viruses**, Basel, v. 2 (12), p. 2649-2662., 2010.

HAAS, J.; PARK, E. C.; SEED, B. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. **Current Biology**, London, v. 6, n. 3, p. 315-324, 1996.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **The Lancet**, London, v. 370, p.1644-1652, 2007.

HANG, T. Y., *et al.* Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid testes for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 3, n. 1, p. E360, 2009.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 54-60, 1998.

HATFIELD, G. W.; ROTH, D. A. Optimizing scale-up yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation Engineering. **Biotechnology Annual Review**, Amsterdam, V. 13, p. 27-42, 2007.

HERRLING, P. Experiments in social responsibility. **Nature**, New York, v. 439, p. 267–268, 2006.

HOLLAND, J. J., *et al.* Rapid evolution of RNA genomes. **Science**, Washington, v. 215, p. 1577-1585, 1982.

HOLLAND, J. J.; DELATORRE, J. C.; STEINHAUER, D. A. A RNA virus populations as quasispecies. In: COMPANS, R. W *et al.* (Ed.). **Currents Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin: Springer Verlag , 1992.

HOLMES, E. C., BURCH, S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiology**, New York, vol. 8, n. 2, p. 74-77, 2000.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution** Amsterdam, v. 3, p. 19-28, 2003.

HOLMES, E. C. The evolutionary biology of dengue virus. **Novartis Foundation Symposium Journal**, Chenchester, v. 277, p.177-187, 2006.

HOLMES, E. C.; WOROBEY, M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, p. 405–409, 1999.

HUANG, J-L., *et al.* High levels of expression of recombinant dengue viral NS1 and its potential use as a diagnostic antigen. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 65, p. 553-560, 2001.

HUANG, C. J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, 2012. No prelo.

HUNSPERGER, E., *et al.* Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. **Emergent Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, p. 436-440, 2009.

IKEMURA, T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. **Journal of Molecular Biology**, London, 151(3), p. 389-409, 1981.

JACOBS, J., *et al.* Homeopathic treatment of acute childhood diarrhea: results from a clinical trial in Nepal. **Journal of Alternative e Complementary Medicine** 6, p. 131-139. New York, 2000.

JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, n. 3, p. 289-298, 2005.

KAMER, G; ARGOS, P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. **Nucleic Acids Research**, London, v. 12, n. 18, p. 7269-7282, 1984.

KANAYA, S., *et al.* Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. **Gene**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 143-55, 1999.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 6, p. 494-500, 1995.

KAO, C. L., KING, C. C., CHAO, D. Y., *et al.* Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, v. 38, n. 1, p. 5-16, 2005.

KERRIGAN, J. J., *et al.* Frameshift events associated with the lysyl-tRNA and the rare arginine codon, AGA, in *Escherichia coli*: a case study involving the human Relaxin 2 protein. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 60, n. 2, p.110-116, 2008.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 71, p. 1497-1505, 1997.

KIM, C. H.; OH, Y.; LEE, T. H. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. **Gene**, Amsterdam, v. 199, n. 1-2, p.293-301, 1997.

KITCHENER, J., *et al.* Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. **Vaccine**, Guildford, v. 24, n. 9, p. 1238-1241, 2006.

KOCHEL, T. J. *et al.* A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. **Vaccine**, Guildford, v. 18, n. 27, p. 3166-3173, 2000.

KOMAR, A. A., *et al.* Enhanced expression of the yeast Ure2 protein in *Escherichia coli*: the effect of synonymous codon substitutions at a selected place in the gene. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 379, n. 10, p. 1295-300, 1998.

KOONIN, E. V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. **The Journal of General Virology**, London, 74, p. 733-740, 1993.

KORAKA, P., *et al.* Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 4154-4159, 2003.

KOTSOPOULOU, E., *et al.* A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 74, p. 4839-4852, 2000.

KUDLA, G., *et al.* Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. **Science**, Washington, v. 324, p. 255-258, 2009.

KUNO, G.; GÓMEZ, I.; GUBLER, D. J. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 33, n. 1-2, p. 101-113, 1991.

KURANE, I., ENNIS, F.E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Seminars in Immunology**, London, v. 4, p.121-127, 1992.

KURLAND, C., GALLANT, J. Errors of heterologous protein expression. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 7, n. 5, p. 489-493, 1996.

LEE, N., ZHANG, S. Q., COZZITORTO, J., *et al.* Modification of mRNA secondary structure and alteration of the expression of human interferon alpha 1 in *Escherichia coli*. **Gene** 8(1), p.77-86. Amsterdam, 1987.

LIMA, V. L. C.; FIGUEIREDO, L. T. M.; CORREA, H. R. Dengue: inquérito sorológico pós-epidêmico em zona urbana do Estado de São Paulo (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 566-574, 1999.

LIN, S. C., LIN, C. R., GUKOVSKY, I., *et al.* Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. **Nature** 15; 364 (6434), p. 208-213. New York, 1993.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: KNIPE, D. M. *et al.* (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: 5 ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2001.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of *flaviviruses*. In: CHAMBERS, T. J.; MONATH, T. P (Ed.). **The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development**. California: Elsevier, 2003.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. In: CHAMBERS, T.J. e MONATH, T. P. **Advances in Virus Research**, The *Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development* 59, p.235-289. California, 2003.

LIU, W. J., *et al.* Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. **Journal of Virology**, London, v. 78, p. 12225–12235, 2004.

LIU, W. J., *et al.* Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. **Journal of Virology**, London, v. 79, p. 1934–1942, 2005.

LU, Y., *et al.* Rapid expression and preparation of the recombinant fusion protein STNFRII-GAD by adenovirus vector system. **Zheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, Beijing, v. 27, n. 8, p.1239-1246, 2011.

LUPI, O. Mosquito-Borne Hemorrhagic Fevers. **The Dermatology Clinic**, Philadelphia, v. 29, p. 33–38, 2011.

LUPI, O.; CARNEIRO, C. G.; COELHO, I. C. B. Manifestações mucocutâneas da dengue. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 4, p. 291-305, 2007.

MAAS, C., *et al.* A Role for Protein Misfolding in Immunogenicity of Biopharmaceuticals. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, p. 2229-2236, 2006.

MACAULEY-PATRICK, S., *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, Chinchester, vol. 22, n.4, p. 249-270, 2005.

MACIEL, I. O., *et al.* Electron and phonon renormalization near charged defects in carbon nanotubes. **Nature Materials**, London, v. 7, p. 878-883, 2008.

MACKENZIE, J. M., *et al.* Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin non-structural proteins NS2A and NS4A. **Virology** 245, p. 203–215. New York, 1998.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, New York, v. 10, Suppl 12, p. S98-109, 2004.

MAHONEY, R., *et al.* Dengue Vaccines Regulatory Pathways: A Report on Two Meetings with Regulators of Developing Countries. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e1000418, 2011.

MARIANNEAU, P.; STEFFAN, A. M.; ROYER, C., *et al.* Differing infection patterns of dengue and *yellow fever* viruses in a human hepatoma cell line. **Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 178, p.1270-1278, 1998.

MARTINEZ-TORRES, M. E. **Dengue hemorrágico em crianças**: editorial. Havana: José Martí, 1990. 180p.

MELO, A. B.; SILVA, M. P. C.; MAGALHAES, M. C. F. Description of a Prospective 17DD Yellow Fever Vaccine Cohort in Recife, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 85, n. 4, p. 739–747, 2011.

MEN, R., *et al.* **Vaccine**, Guildford, v. 18, p. 3113–3122, 2000.

METZ, C. E. Basic principles of ROC analysis. **Seminars in Nuclear Medicine**, New York, v. 8, n. 4, p. 283-298, 1978.

MIAGOSTOVICH, M. P.; VORNDAM, V.; ARAÚJO, E. S. M. Evaluation of IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 14, p. 183-189, 1999.

MODIS, Y., *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, New York, 427, p. 313-319, 2004.

MUMBERG, D.; MAILER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds (*Saccharomyces cerevisiae*; plasmid; multicopy vector; polylinker; promoter; heterologous expression; cDNA cloning). **Gene**, Amsterdam, v. 156, p. 119-122, 1995.

MURPHY, F. A. *Togavirus* morphology and morphogenesis. In: SCHLESINGER, R. W (Ed.). **The *Togaviruses***. Biology, Structure, Replication. New York: Academic Press, 1980.

MUYLAERT, I.R., *et al.* Analysis of antibody reactivity to dengue and other flavivirus antigens by Western Blotting. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 4º, São Lourenço, 1988. **Resumos do 4º Encontro Nacional de Virologia**. São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, 1988.

NAVARRE, W. W., PORWOLLIK, S., WANG, Y., *et al.* Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. **Science** 313 (5784), p. 236-238. Washington, 2006.

NILSSON, M. R., DOBSON, C. M. Chemical modification of insulin in amyloid fibrils. **Protein Science** 12, p. 2637–2641. New York, 2003.

NOGUEIRA, R. M. R., ZAGNER, S. M. O, MARTINS, I. S. M., *et al.* Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 86, p.269. Rio de Janeiro, 1991.

NOGUEIRA R. M. R., MIAGOSTOVICH, M. P., FILIPIS, A. M. P., *et al.* Dengue virus type 2 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 96, p. 925-926. Rio de Janeiro, 2001.

NUC, P.; NUC, K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Postepy Biochemistry**, Warszawa, v. 52, n. 4, p. 448-456, 2006.

NYMAN, T.; PAGE, R.; SCHUTT, C. E. A cross-linked profilin-actin heterodimer interferes with elongation at the fast-growing end of F-actin. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 18, p.15828-15833, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Strengthening Implementation of the Global Strategy for Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever Prevention and Control**. Presented at Report of the Informal Consultation. Geneva, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue control**. The mosquito. Geneva, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/en/index.html>>. Acesso em: 1 maio 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Thai researcher debunks dengue fever myth – warnings for 2011 wet season**. Geneva, 2011a. Disponível em: <<http://photo-journ.com/2011/thai-researcher-debunks-dengue-fever-myth-warnings-for-2011-wet-season#axzz1jCAWolq1>>. Acesso: 04 jan. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Impact of Dengue**. Geneva, 2011b. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>>. Acesso em: 1 maio 2011.

OOI, E. E.; WILDER-SMITH, A.; NG, L. C. The 2007 dengue outbreak in Singapore. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 138, n. 7, p. 958-959, 2010.

OSANAI, C. H. **A epidemia de dengue em Boa Vista, Território Federal de Roraima, 1981-1982**. 1984. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2003.

OXENDER, D. L.; ZURAWSKI, G.; YANOFSKY, C. Attenuation in the *Escherichia coli* tryptophan operon: role of RNA secondary structure involving the tryptophan codon region. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 11, p. 5524-5528, 1979.

PALOMARES, L. A., MENA, J. A., RAMÍREZ, O. T. Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: Production of virus-like particles. **Methods**, Duluth, 2012. No prelo.

PARKIN, N. T.; CHAMORRO, M.; VARMUS, H. E. Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 66, n. 8, p. 5147-5151, 1992.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural Proteomics of Dengue Virus. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.

PERERA, R., KHALIQ, M., KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Research** 80, p. 11-22. Amsterdam, 2008.

PERRET, B. G., WAGNER, R., LECAT, S., *et al.* Expression of EGFP-amino-tagged human mu opioid receptor in Drosophila Schneider 2 cells: a potential expression system for large-scale production of G-protein coupled receptors. **Protein Expression and Purification** 31(1), P.123-132. San Diego, 2003.

PIMENTA JR, F. G. **Instrumento para avaliar a implantação do Programa Nacional de Controle do Dengue no âmbito municipal**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2005.

PINHEIRO, F.; NELSON, M. Re-emergence of dengue and emergence of dengue haemorrhagic fever in the Americas. **Dengue Bulletin**, New Delhi, v. 21. p. 16-24, 1997.

PRYOR, M. J.; WRIGHT, P. J. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. **Virology**, New York, v. 194, n. 2, p. 769-780, 1993.

PUTNAK, J. R., *et al.* An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in rhesus macaque model. **Vaccine**, Guildford, v. 23, p. 4442–4452, 2005.

QIAGEN. **LiquiChip[®] Applications Handbook**. For protein-based suspension arrays using xMAP technology. 2 ed. Germantown: Qiagen, 2006.

QUEIROZ-LIMA, M. R., *et al.* A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 5, p.e1147, 2011.

RAMAKRISHNA, L., *et al.* Codon optimization of the tat antigen of human immunodeficiency virus type 1 generates strong immune responses in mice following genetic immunization. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 78, n. 17, p. 9174-9189, 2004.

RAMOS, C. Dicroísmo circular para a análise da conformação de proteínas: uma visão prática. In: _____, **A arte da caracterização e separação de proteínas**. Fortaleza: RDS gráfica, 2008.

RAVIPRAKASH, K., *et al.* Needle-free Biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in *Aotus* monkeys. **Virology**, New York, v. 315, n. 2, p. 345-352, 2003.

RESCH, B., MITTLBOECK, M., GIRARDIN, F. *et al.* Live Geography – Embedded Sensing for Standardised Urban Environmental Monitoring. **International Journal on Advances in Systems and Measurements**, Cancun, v. 2, n. 2-3, p. 156-167, 2009.

REY, F. A.; HEINZ, F. X.; MANDL, C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, New York, v. 375, p. 291–298, 1995.

RICE, C. M., *et al.* Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science** 229 (4715), p. 726-733. Washington, 1985.

RICE, C. M. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: KNIPE, D. M. *et al.* (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: 5 ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2001.

GRINER, P. F., *et al.* Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 94, p. 555-600, 1981.

RODHAIN, F.; ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. Wallingford: CAB International, 1997.

RODHAIN, F. The role of monkeys in the biology of dengue and yellow fever. **Comparative Immunology, Microbiology e Infectious Diseases**, Oxford, v. 14, n. 1, p.9-19, 1991.

ROSE, A. B.; BROACH, J. R. Propagation and expression of cloned genes in yeast. **Methods in Enzymology**, New York, v. 185, p. 234-279, 1990.

ROSS, T. M. Dengue virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 149-160, 2010.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 113, n. 7, p. 946-951, 2004.

ROUWENDAL, G. J., MENDES, O., WOLBERT, E. J., *et al.* Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 33, n. 6, p. 989-999, 1997.

RUIZ, L., REYES, N., AROCHE, K., *et al.* **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Edmonton, v. 8, p. 207–216, 2005.

RUSH, B. An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia, in the summer and autumn of the year 1780. **Medical inquires and observations**, Philadelphia, p. 89–100, 1789.

PRYOR, M. J.; WRIGHT, P. J. Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. **Journal of General Virology**, London, v. 75, p. 1183-1187, 1994.

SCHATZMAYR, H.G., NOGUEIRA, R.M.R., ROSA, A.P.A.T. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 245-246, 1986.

SEMON, M., MOUCHIROUD, D., DURET, L. Relationship between gene expression and GC-content in mammals: statistical significance and biological relevance. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 421-427, 2005.

SHU, P; HUANG, J. Current Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n. 4, p. 642–650, 2004.

SHU, P. Y., *et al.* Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 6, p. 2489-2494, 2004.

SHU, P., *et al.* Application of the Dengue Virus NS1 Antigen Rapid Test for On-Site Detection of Imported Dengue Cases at Airports. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 16, n. 4, p.589–591, 2009.

SHUIPING, C., *et al.* Induction of Tetravalent Protective Immunity Against Four Dengue Serotypes by the Tandem Domain III of the Envelope Protein. **DNA and Cell Biology**, Larchmont, v. 26, n. 6, p. 361-367, 2007.

SILER, J. F.; HALL, M. W.; HITCHENS, A. P. Dengue: its history, epidemiology, mechanisms of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Philippines Journal of Science**, Philippine Islands, v. 29, p. 1–304, 1926.

SILVA, A. M., *et al.* Serologic evidence for a epizootic dengue virus infecting toque macaques (*Macaca sinica*) at Pollonnarwa, Sri Lanka. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, p. 300-306, 1999.

SILVA, N. S.; OFEK, I.; CROUCH, E. C. Interactions of surfactant protein D with fatty acids. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 29, n. 6, p. 757-770, 2003.

SILVA-NUNES, M., *et al.* The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 6, p. 1325-1334, 2006.

SINGHI, S., *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Journal of Pediatrics**, Rio de Janeiro, v. 83, Suppl 2, p. S22-35, 2007.

SINZ, A. Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. **Journal of Mass Spectrometry**, New York, v. 38, n. 12, p.1225-1237, 2003.

SLIMKO, E. M., LESTER, H. A. Codon optimization of *Caenorhabditis elegans* GluCl ion channel genes for mammalian cells dramatically improves expression levels. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p.75-81, 2003.

SMITH, P. L., *et al.* A rapid, sensitive, multiplexed assay for detection of viral nucleic acids using the FlowMetrix system. **Clinical Chemistry**, Edinburgh, v. 44, p. 2054–2060, 1998.

STAROS, J. V., WRIGHT, R. W., SWINGLE, D. M. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 156, n. 1, p. 220-222, 1986.

STATHOPULOS, P. B., *et al.* Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. **Protein Science**, New York, v. 13, p. 3017–3027, 2004.

STEWART, C. R., *et al.* **Biochemistry**, New York, v. 44, p. 9108–9116, 2005.

SUAYA, J. A., SHEPARD, D. S., BEATTY, M. E. **Dengue burden of disease and cost of illness**. Special Programme for Research e Training in Tropical Diseases (TDR), World Health Organization. Geneva: World Health Organization, 2007.

SUGRUE, R. J., *et al.* The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 159-169, 1997.

TAN, B. H.; FU, J. L.; SUGRUE, R. J. Characterization of the dengue virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. **Methods in Molecular Biology**, Clifton , v. 379, p. 163-176, 2007.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, 2002.

THERMO SCIENTIFIC. Melon™ Gel IgG Purification Kit. Instructions. Rockford, 2011. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/instructions/2161512.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

TITO, B. J., *et al.* Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 177, p. 7086–7091, 1995.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A.; BISWAL, K. C. Recombinant dengue virus type 3 envelope domain III protein from *Escherichia coli*. **Biotechnology Journal**. Cellular e Molecular Bioengineering, Weinheim, v. 6, n. 5, p. 604–608, 2011. (Special Issue).

TSUCHIHASHI, Z.; BROWN, P. O. Sequence requirements for efficient translational frameshifting in the *Escherichia coli* dnaX gene and the role of an unstable interaction between tRNA(Lys) and an AAG lysine codon. **Genes e Development**, New York, v. 6, n. 3, p. 511-519, 1992.

VASCONCELOS, P. F. C., *et al.* Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaiana, Tocantins, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 141-148, 1993.

VENTER, J. C., *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, Washington, v. 304, p. 66–74, 2004.

VERVOORT, E. B., *et al.* Optimizing heterologous expression in dictyostelium: importance of 5' codon adaptation. **Nucleic Acids Research**, London, v. 28, n. 1, p. 2069-2074, 2000.

VINOGRADOV, A. E. Noncoding DNA, isochores and gene expression: nucleosome formation potential. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, n. 2, p. 559-563, 2005.

WAHALA, W. M. P. B., *et al.* Natural Strain Variation and Antibody Neutralization of Dengue Serotype 3 Viruses. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 3, 2010.

WALLACE, J., *et al.* BARCODE-ALL: Accelerated and cost effective genetic risk-stratification in acute leukemia using spectrally addressable liquid bead microarrays. **Leukemia**, Baltimore, v. 17, p. 1404–1410, 2003.

WALLIS, T.P., *et al.* Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 20, p. 20729-20741, 2004.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 203, p. 1–60, 2000.

WEI, H.; JIANG, L.; XUE, Y. Secreted expression of dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p.17–23, 2002.

WEISS, R. B. Ribosomal frameshifting, jumping and readthrough. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 3, n. 6, p.1051-1055, 1991.

WELCH, M., GOVINDARAJAN, S., NESS, J.E. Design Parameters to Control Synthetic Gene Expression in *Escherichia coli*. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 9, p. e7002, 2009.

WELCH, M., *et al.* You're one in a googol: optimizing genes for protein expression. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v. 6, p. S467–S476, 2009.

WESTAWAY, E. G.; MACKENZIE, J. M.; KHROMYKH, A. A. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. **Advances in Virus Research**, New York, v. 59, p. 99-140, 2003.

WHITEHEAD, S. S.; FALGOUT, B.; HANLEY, K. A. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, p. 1653-1657, 2003.

WINKLER, G. *et al.* Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. **Virology**, New York, v. 162, p. 187-196, 1988.

WINKLER, G. *et al.* Newly synthesized dengue -2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane associated after dimerization. **Virology**, New York, v. 171, p. 302-305, 1989.

WITT, S., *et al.* Comparative biochemical analysis suggests that vinculin and metavinculin cooperate in muscular adhesion sites. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 31533-31543, 2004.

WONG, S. J., *et al.* Detection of Human Anti-Flavivirus Antibodies with a *West Nile* Virus Recombinant Antigen Microsphere Immunoassay. **The Journal of Clinical Microbiology**, Baltimore, v. 42, n. 1, p. 65-72, 2004.

WOODY, R.W. Circular dichroism. **Methods in Enzymology**, New York, v. 246, p. 34-71, 1995.

WOROBAY, M., RAMBAUT, A., HOLMES, E. C. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 96, n. 13, p. 7352-7357, 1999.

WU, S. F., LIAO, C. L., LIN, Y. L., *et al.* Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. **Vaccine**, Guildford, v. 21, n. 25-26, p. 3919-3929, 2003.

WU, G., ZHENG, Y., QURESHI, I., *et al.* SGDB: a database of synthetic genes re-designed for optimizing protein over-expression. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. D76-79, 2007.

YOUNG, P., PAIGE, A., BLETCHLY, C. *et al.* An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 1053-1057, 2000.

ZHAO, B., MACKOW, E., BUCKLER-WHITE, A., *et al.* Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequences: analysis of genes coding for structural proteins. **Virology**, New York, v. 155, p. 77-88, 1986.

ZHAO, H., TUOMINEN, E. K., KINNUNEN, P. K. **Biochemistry**, New York, v. 43, p. 10302-10307, 2004.

ZHOU, J. M., TANG, Y. X., FANG, D. Y., *et al.* Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*. **Virus Genes**, Boston, v. 33, n. 1, p. 27-32, 2006.

ZHOU, J., LIU, W. J., PENG, S. W. *et al.* Papillomavirus Capsid Protein Expression Level Depends on the Match between Codon Usage and tRNA Availability. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 73, n. 6, p. 4972-4982, 1999.

ZHOU, Z., SCHNAKE, P., XIAO, *et al.* Enhanced expression of a recombinant malaria candidate vaccine in *Escherichia coli* by codon optimization. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 34, p. 87–94, 2004.

ZHU, M., SOUILLAC, P. O., IONESCU-ZANETTI, C., *et al.* Surface-catalyzed amyloid fibril formation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, p. 50914–50922, 2002.

ZULUETA, A., *et al.* Amino acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. **Virus Research**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 65-73, 2006.

ZWEIG, M. H.; CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clinical Chemistry**, Edinburgh, v. 39, p. 561-577, 1993.

APÊNDICE A: RELATÓRIO DE OTIMIZAÇÃO DO GENE DENV NS1 SOROTIPO 1



Optimization report

Created with Leto 1.0

1 General Information:

Gene: DENV_NS1_CONSENSUS_TYPE_1
 Optimization requested by:
 Date: Oct 7, 2009
 Operator: rdhalia
 Target organism: K_Lactis_E_Coli_50%
 Optimization iteration: 1
 Length: 1134 bp

1.1 Sequence

Below the original sequence and optimized sequence are listed, labelled with 'Org:' and 'Opt:' respectively. Where both are identical, the original sequence contains dots instead of nucleotides ('.'). Where the original sequence was locked against editing, it contains underscores ('_'). The names of the restriction enzymes start at the first nucleotide after the restriction cut in the forward strand.

```

      5      10      15      20      25      30      35      40      45      50
ORF:                M  S  L  E  K  R  H  M  T  S  D  S  G
Org: _____ ..A ..A _____ ... AGC ..G
Opt: AAGCT TAAAA AA ATG TCT CTC GAG AAG AGG CAT ATG ACT AGT GAC TCA GGT
      HindIII                XhoI                NdeI      SpeI

      55      60      65      70      75      80      85      90      95
ORF:  C  V  I  N  W  K  G  R  E  L  K  C  G  S  G  I
Org:  ... ..G ..T ... ..T ..A ..A ..G ..A ... .. AG. ..C ..C
Opt:  TGT GTA ATC AAT TGG AAA GGA AGG GAG CTT AAG TGC GGT TCT GGT ATT

     100     105     110     115     120     125     130     135     140     145
ORF:  F  V  T  N  E  V  H  T  W  T  E  Q  Y  K  F  Q
Org:  ... ..C ... ..T ..G ..T ... ..T ... ..G ... ..A ... ..C ..A
Opt:  TTT GTA ACC AAC GAA GTC CAT ACG TGG ACC GAA CAG TAC AAA TTT CAG

```

150 155 160 165 170 175 180 185 190 195
 ORF: A D S P K R L S A A I G K A W E
 Org: ..C ..C ..A ..T ... C.G C.T ..TAG ..G ..G
 Opt: GCT GAT TCG CCA AAA AGA TTG AGC GCT GCT ATC GGA AAA GCC TGG GAA

200 205 210 215 220 225 230 235 240
 ORF: E G V C G I R S A T R L E N I M
 Org:T ..TA ..A C.GT ..C C.G C.G ..GA ...
 Opt: GAA GGA GTC TGC GGT ATC AGA TCT GCC ACA AGA TTA GAA AAT ATT ATG

245 250 255 260 265 270 275 280 285 290
 ORF: W K Q I S N E L N H I L L E N D
 Org:AT T.A ..C ..C ..CG ..G
 Opt: TGG AAG CAA ATC TCA AAT GAG CTG AAT CAT ATA CTG TTA GAA AAT GAC

295 300 305 310 315 320 325 330 335
 ORF: M K F T V V V G D A N G I L A Q
 Org:G ..T ..A ..A ..C ..GC ..GT ... T.A ..T ..A
 Opt: ATG AAA TTC ACC GTT GTG GTC GGT GAT GCC AAT GGA ATA CTT GCA CAG

340 345 350 355 360 365 370 375 380 385
 ORF: G K K M I R P Q P M E H K Y S W
 Org:GT ..ACAG
 Opt: GGA AAA AAA ATG ATA AGG CCT CAA CCT ATG GAG CAC AAA TAT TCT TGG

390 395 400 405 410 415 420 425 430 435
 ORF: K S W G K A K I I G A D I Q N T
 Org: ..G ..AG ..AAC ..A ..CG
 Opt: AAA TCC TGG GGA AAA GCC AAG ATC ATT GGT GCC GAT ATC CAA AAC ACG

440 445 450 455 460 465 470 475 480
 ORF: T F I I D G P D T P E C P D D Q
 Org:C ..C ..C ..T ..T ..T ..T ..GCA
 Opt: ACG TTC ATT ATT GAT GGT CCA GAC ACA CCG GAA TGT CCA GAT GAT CAG

485 490 495 500 505 510 515 520 525 530
 ORF: R A W N I W E V E D Y G F G I F
 Org:GT ..CG ..ACTC ..T ...
 Opt: AGG GCT TGG AAC ATT TGG GAA GTT GAA GAT TAC GGA TTC GGT ATC TTT

535 540 545 550 555 560 565 570 575
 ORF: T T N I W L K L R D S Y T Q M C
 Org: ..C ..G ..T ..C ... T.A ..G ..A ..A ..C TCTGT
 Opt: ACA ACA AAC ATT TGG CTG AAA CTG CGT GAT AGC TAT ACT CAA ATG TGC

580 585 590 595 600 605 610 615 620 625
 ORF: D H R L M S A A I K D S K A V H
 Org: ..C ..C ..A ..AG ..G ..T ..AC ..G ..G
 Opt: GAT CAT CGT CTG ATG TCT GCA GCA ATT AAG GAC TCA AAA GCT GTT CAC

630 635 640 645 650 655 660 665 670 675
 ORF: A D M G Y W I E S E K N E T W K
 Org: ..G ..CG ..CA ... AGT ..GC ..G
 Opt: GCA GAT ATG GGT TAT TGG ATT GAA TCA GAA AAG AAT GAA ACC TGG AAA

680 685 690 695 700 705 710 715 720
 ORF: L A R A S F I E V K T C I W P K
 Org: T.A ..G ..A ..T ..GT ..GGAT ...
 Opt: CTT GCA CGT GCA TCT TTC ATA GAA GTT AAA ACT TGT ATT TGG CCG AAA

725 730 735 740 745 750 755 760 765 770
 ORF: S H T L W S N G V L E S E M I I
 Org: TCCG C.CT ..T ..A ..G ..C ... AGTT ..A
 Opt: AGT CAT ACT TTG TGG TCC AAC GGT GTT CTG GAG TCG GAA ATG ATA ATC

775 780 785 790 795 800 805 810 815
 ORF: P K I Y G G P I S Q H N Y R P G
 Org: ..ATG ..G ..T ..C AGCT ..T ... A.A ..C ..C
 Opt: CCG AAG ATC TAC GGA GGA CCA ATT TCA CAA CAC AAC TAT CGT CCA GGT

820 825 830 835 840 845 850 855 860 865
 ORF: Y F T Q T A G P W H L G K L E L
 Org:A ..AAAC.C ..C ... C.A ..G C.C
 Opt: TAT TTC ACT CAG ACG GCT GGT CCT TGG CAC TTG GGT AAA TTG GAA TTG

870 875 880 885 890 895 900 905 910 915
 ORF: D F D L C E G T T V V V D E H C
 Org:C ..C T.A ..CG ..C ..G ..C ..A ..TT
 Opt: GAT TTT GAT CTT TGT GAA GGT ACA ACT GTT GTG GTG GAC GAG CAT TGC

920 925 930 935 940 945 950 955 960
 ORF: G N R G P S L R T T T V T G K I
 Org: ..A ..CC ..C ..G ..GG ..G ..T ..A ..A ...
 Opt: GGT AAT CGT GGT CCG AGT TTG AGA ACT ACA ACT GTC ACC GGT AAG ATA

965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010
 ORF: I H E W C C R S C T L P P L R F
 Org:CC ..C C.G ..T ..C ..TC ..C ..A ..G ..C
 Opt: ATT CAT GAA TGG TGT TGT AGA AGC TGT ACC TTA CCA CCT CTG AGA TTT

```

      1015  1020  1025  1030  1035  1040  1045  1050  1055
ORF:  R   G   E   D   G   C   W   Y   G   M   E   I   R   P   V   K
Org:  ..G ... ..A ... ..A ..C ... ..T ... ..A ..C ..A ... ..A
Opt:  AGA GGA GAG GAC GGT TGT TGG TAC GGT ATG GAG ATT CGT CCT GTT AAG

```

```

      1060  1065  1070  1075  1080  1085  1090  1095  1100  1105
ORF:  E   K   E   E   N   L   V   R   S   M   V   S   A   G   G   S
Org:  ..G ... ..A ... ..C ... ..C.. TCC ... ..C AG. ..A ..T ___ ___
Opt:  GAA AAG GAG GAA AAT TTG GTA AGA AGT ATG GTG TCT GCC GGA GGC TCT

```

```

      1110  1115  1120  1125  1130
ORF:  S   C   A   A   A   !
Org:  ___ ___ ___ ___ ___ ___ ___ ___
Opt:  TCC TGC GCG GCC GCT TGA TAACC ATGG
           NotI             NcoI

```

1.1.1 Restriction table

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
HindIII	a'agct_t	1	0
NcoI	c'catg_g	1	1128
NdeI	ca'ta_tg	1	30
NotI	gc'ggcc_gc	1	1113
SpeI	a'ctag_t	1	36
XhoI	c'tcga_g	1	18

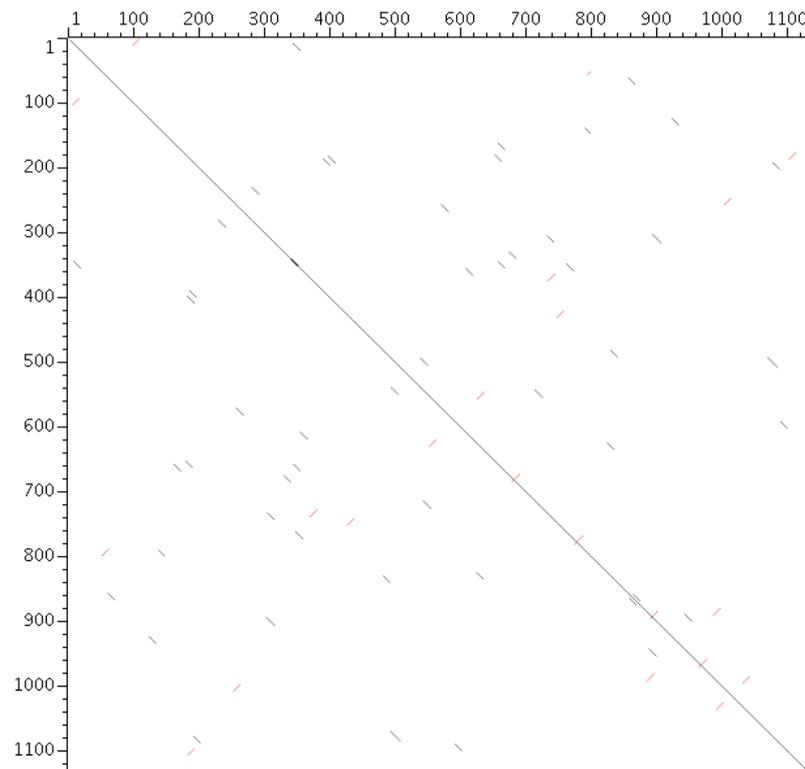
1.1.2 Enzymes that cut five or fewer times

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
HindIII	a'agct_t	1	0
NcoI	c'catg_g	1	1128
NdeI	ca'ta_tg	1	30
NotI	gc'ggcc_gc	1	1113
SpeI	a'ctag_t	1	36
XhoI	c'tcga_g	1	18

1.1.3 Enzymes that do not cut

SacII

1.2 Dotplot



1.3 ORFs

The gene was optimized using the following ORF(s). Please note that sequence positions are given relative to the continuous DNA sequence defined by all ORFs:

ORF: 13-1125

2 Optimized parameters

2.1 Codon tandem repeats

Number of codon tandem repeats:

Original sequence: 6

Optimized sequence: 11

Position	Number of repeats
[159]	2
[180]	2
[330]	2
[420]	2
[429]	2
[462]	2
[519]	2

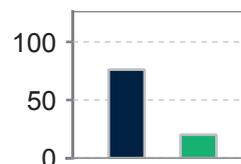
[585]	2
[771]	2
[885]	2
[963]	2

2.2 Codon Usage

This is a comparison of the codon frequency of the original sequence vs. the optimized sequence. As a reference, the codon usage of the target organism is included. The charts indicate the sum of the deviation from the target codon usage, for the original and the optimized sequence. Lower bars indicate a better match with the target codon usage.

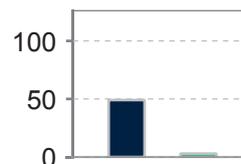
2.2.1 A - Alanine:

Codon	Original	Target	Optimized
GCU	28.6 %	40.0 %	33.3 %
GCC	9.5 %	28.0 %	33.3 %
GCA	23.8 %	32.0 %	28.6 %
GCG	38.1 %	0.0 %	4.8 %



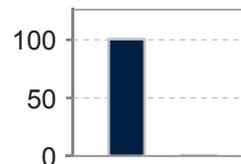
2.2.2 C - Cysteine:

Codon	Original	Target	Optimized
UGU	38.5 %	63.0 %	61.5 %
UGC	61.5 %	37.0 %	38.5 %



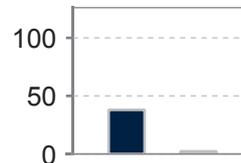
2.2.3 D - Aspartic acid:

Codon	Original	Target	Optimized
GAU	16.7 %	67.0 %	66.7 %
GAC	83.3 %	33.0 %	33.3 %



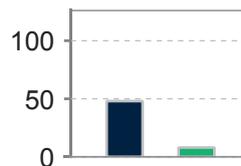
2.2.4 E - Glutamic acid:

Codon	Original	Target	Optimized
GAA	50.0 %	69.0 %	67.9 %
GAG	50.0 %	31.0 %	32.1 %



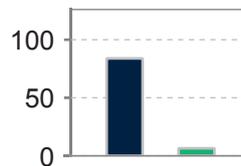
2.2.5 F - Phenylalanine:

Codon	Original	Target	Optimized
UUU	30.0 %	54.0 %	50.0 %
UUC	70.0 %	46.0 %	50.0 %



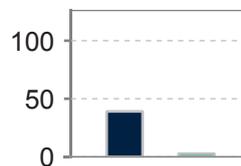
2.2.6 G - Glycine:

Codon	Original	Target	Optimized
GGU	32.3 %	64.0 %	61.3 %
GGC	22.6 %	0.0 %	3.2 %
GGA	25.8 %	36.0 %	35.5 %
GGG	19.4 %	0.0 %	0.0 %



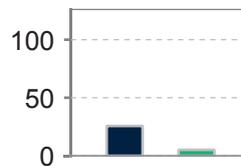
2.2.7 H - Histidine:

Codon	Original	Target	Optimized
CAU	45.5 %	65.0 %	63.6 %
CAC	54.5 %	35.0 %	36.4 %



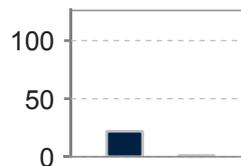
2.2.8 I - Isoleucine:

Codon	Original	Target	Optimized
AUU	32.1 %	45.0 %	46.4 %
AUC	35.7 %	31.0 %	32.1 %
AUA	32.1 %	24.0 %	21.4 %



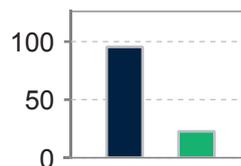
2.2.9 K - Lysine:

Codon	Original	Target	Optimized
AAA	50.0 %	61.0 %	61.5 %
AAG	50.0 %	39.0 %	38.5 %



2.2.10 L - Leucine:

Codon	Original	Target	Optimized
UUA	27.3 %	25.0 %	13.6 %
UUG	9.1 %	29.0 %	31.8 %
CUU	4.5 %	17.0 %	18.2 %
CUC	27.3 %	0.0 %	4.5 %
CUA	18.2 %	0.0 %	0.0 %
CUG	13.6 %	29.0 %	31.8 %



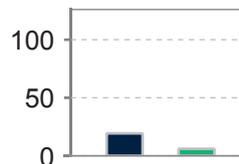
2.2.11 M - Methionine:

Codon	Original	Target	Optimized
AUG	100.0 %	100.0 %	100.0 %



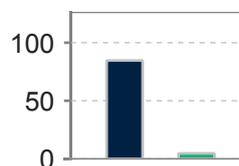
2.2.12 N - Asparagine:

Codon	Original	Target	Optimized
AAU	66.7 %	57.0 %	60.0 %
AAC	33.3 %	43.0 %	40.0 %



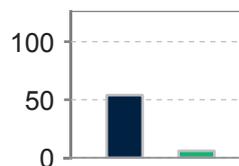
2.2.13 P - Proline:

Codon	Original	Target	Optimized
CCU	46.7 %	31.0 %	33.3 %
CCC	26.7 %	0.0 %	0.0 %
CCA	20.0 %	40.0 %	40.0 %
CCG	6.7 %	29.0 %	26.7 %



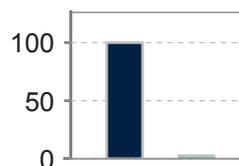
2.2.14 Q - Glutamine:

Codon	Original	Target	Optimized
CAA	80.0 %	53.0 %	50.0 %
CAG	20.0 %	47.0 %	50.0 %



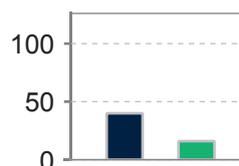
2.2.15 R - Arginine:

Codon	Original	Target	Optimized
CGU	5.6 %	32.0 %	33.3 %
CGC	0.0 %	0.0 %	0.0 %
CGA	27.8 %	0.0 %	0.0 %
CGG	22.2 %	0.0 %	0.0 %
AGA	22.2 %	45.0 %	44.4 %
AGG	22.2 %	23.0 %	22.2 %



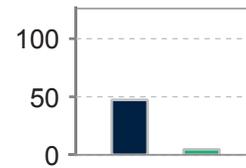
2.2.16 S - Serine:

Codon	Original	Target	Optimized
UCU	32.0 %	26.0 %	32.0 %
UCC	16.0 %	14.0 %	12.0 %
UCA	8.0 %	18.0 %	20.0 %
UCG	8.0 %	10.0 %	8.0 %
AGU	28.0 %	16.0 %	16.0 %
AGC	8.0 %	16.0 %	12.0 %



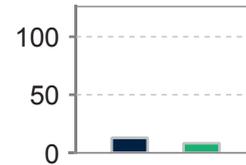
2.2.17 T - Threonine:

Codon	Original	Target	Optimized
ACU	25.0 %	31.0 %	33.3 %
ACC	20.8 %	26.0 %	25.0 %
ACA	12.5 %	25.0 %	25.0 %
ACG	41.7 %	18.0 %	16.7 %



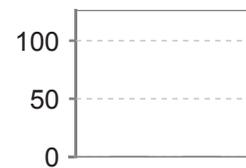
2.2.18 V - Valine:

Codon	Original	Target	Optimized
GUU	33.3 %	37.0 %	38.9 %
GUC	22.2 %	20.0 %	22.2 %
GUA	22.2 %	18.0 %	16.7 %
GUG	22.2 %	25.0 %	22.2 %



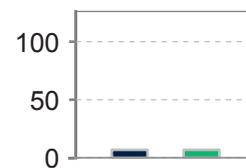
2.2.19 W - Tryptophan:

Codon	Original	Target	Optimized
UGG	100.0 %	100.0 %	100.0 %



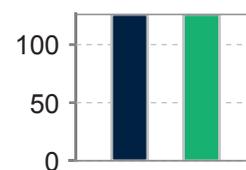
2.2.20 Y - Tyrosine:

Codon	Original	Target	Optimized
UAU	55.6 %	59.0 %	55.6 %
UAC	44.4 %	41.0 %	44.4 %



2.2.21 ! - Stop:

Codon	Original	Target	Optimized
UAA	0.0 %	63.0 %	0.0 %
UGA	100.0 %	37.0 %	100.0 %
UAG	0.0 %	0.0 %	0.0 %

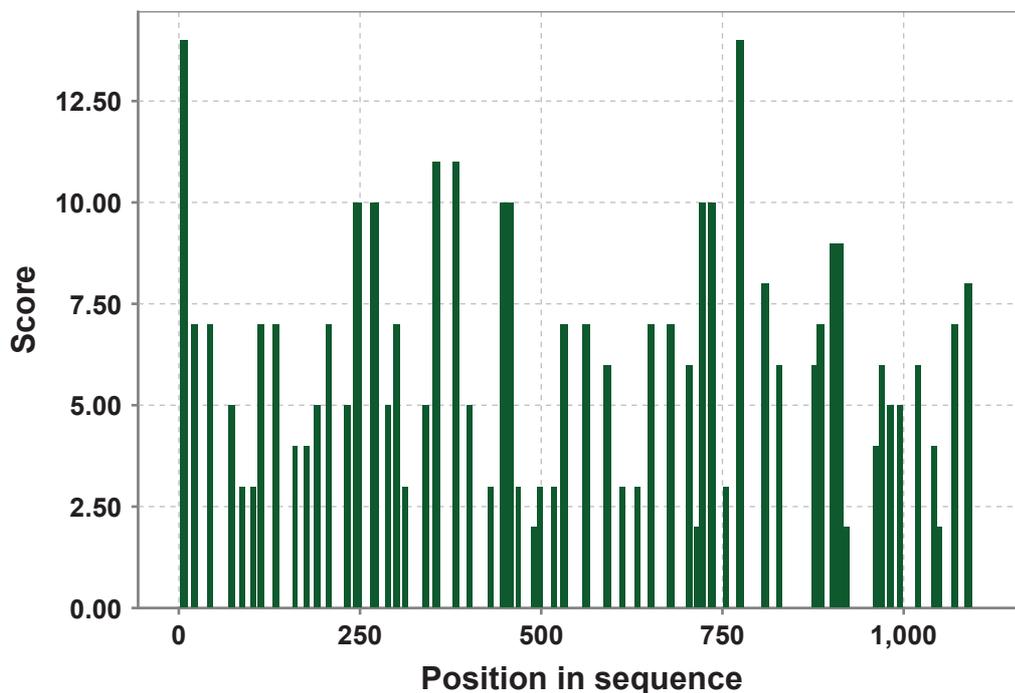


2.3 Secondary structure

In general, an extended secondary structure of the mRNA can interfere with the translation process. Therefore, the gene optimization tries to reduce the number and length of potential hairpin loops.

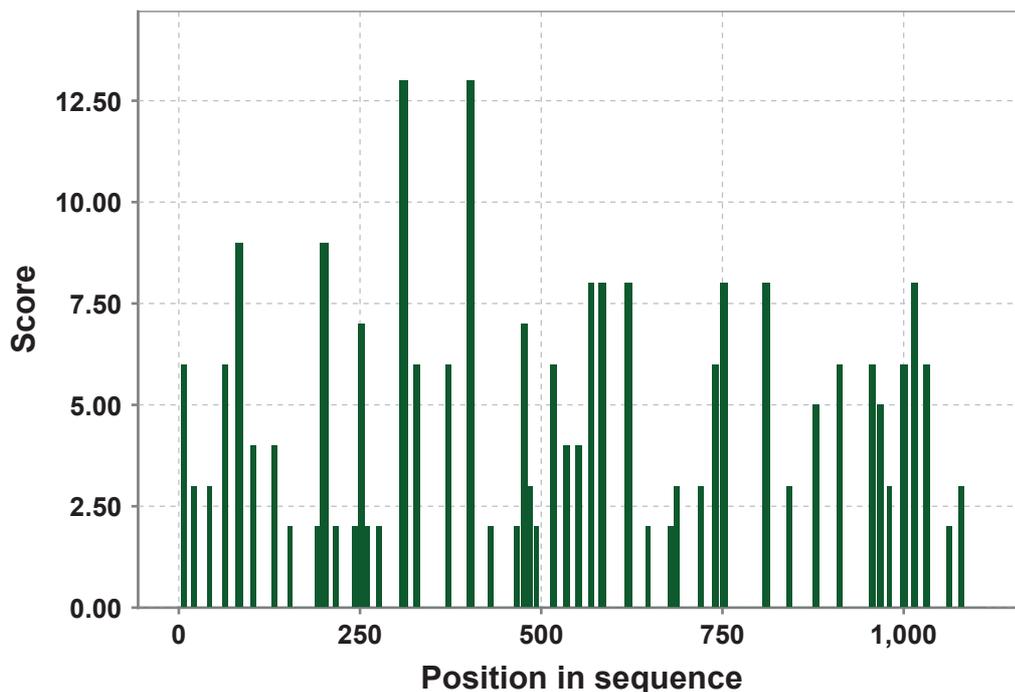
2.3.1 Original sequence

Number of helices	29
Average helix length	6.21
Maximum helix length	9
Average helix score	6.17



2.3.2 Optimized sequence

Number of helices	24
Average helix length	6.00
Maximum helix length	9
Average helix score	5.00



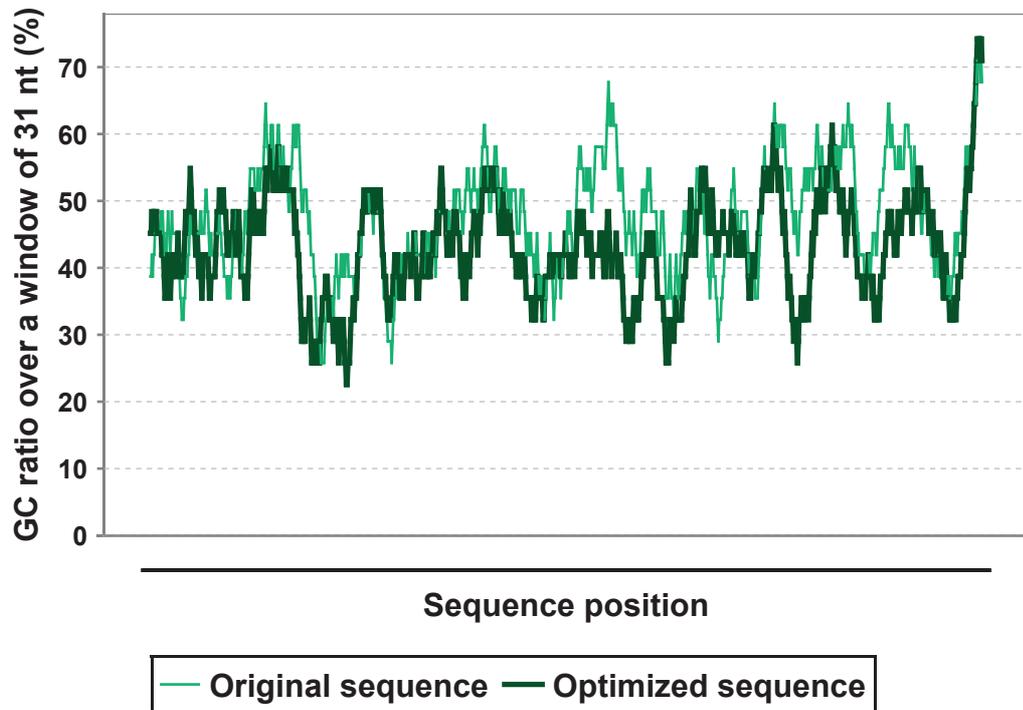
2.4 GC distribution

GC ratio over a window of 31 nt:

Original sequence: 47.62% (25.81% - 70.97%)

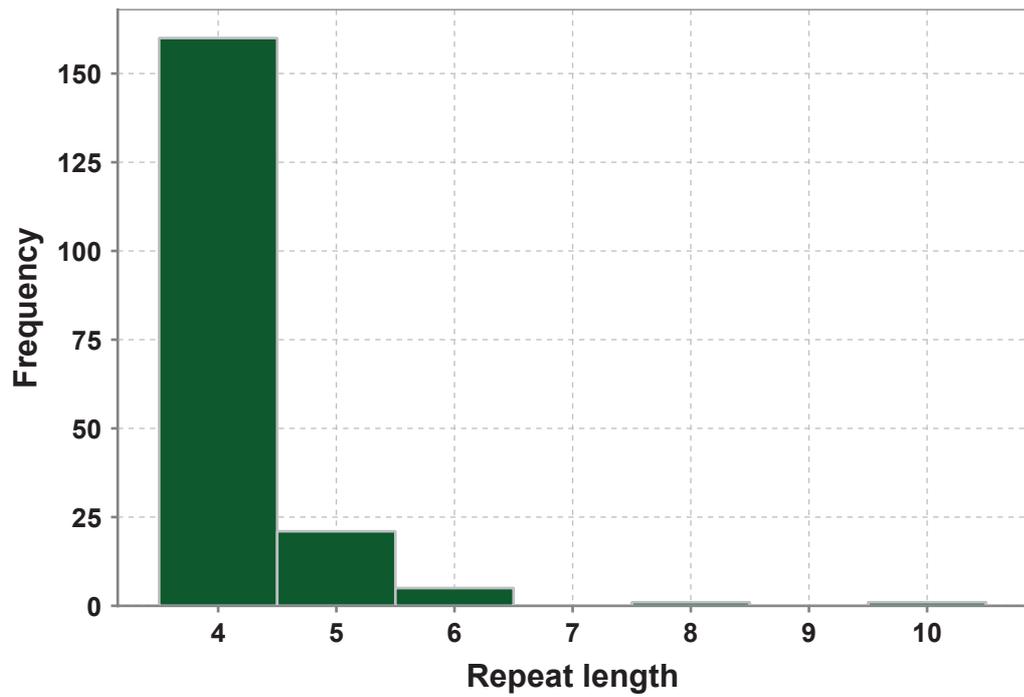
Optimized sequence: 43.40% (22.58% - 74.19%)

The number indicate the average GC content. The values in brackets indicate the interval containing 95% of all nucleotides if the GC content is averaged over a window of 11 nucleotides.



2.5 Long range repeats

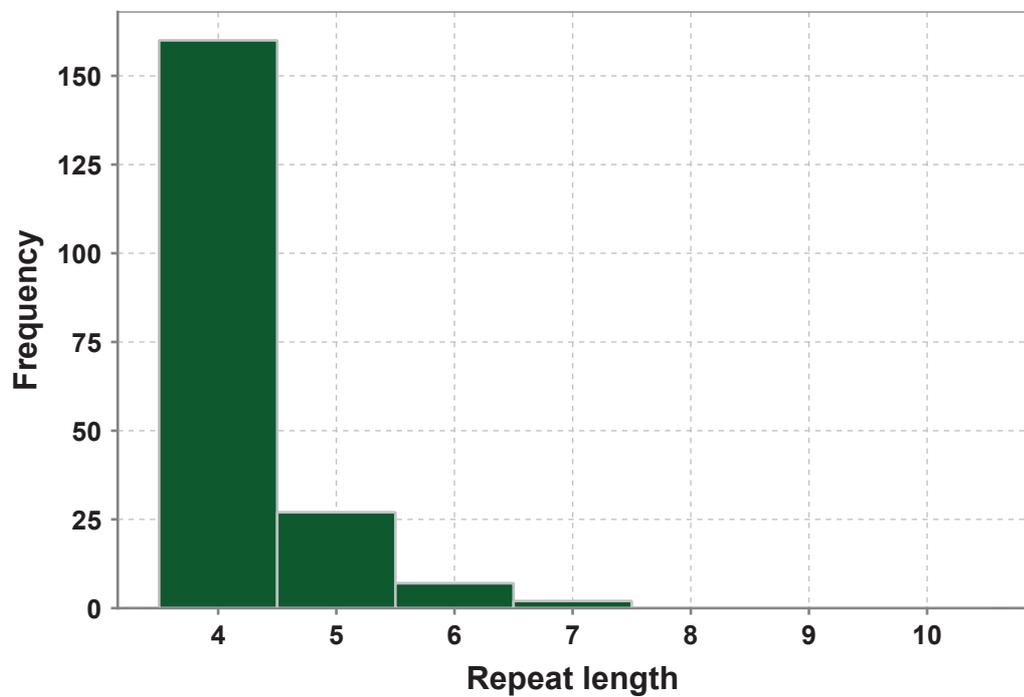
2.5.1 Original sequence



Number of repeats: 188

Longest repetitive sequence: 10 bases

2.5.2 Optimized sequence



Number of repeats: 196

Longest repetitive sequence: 7 bases

2.6 Secondary ORFs

During the optimization, secondary ORFs were removed. These are ORFs in the second or third frame or on the opposite strand. The removal was done by inserting stop codons by silent mutagenesis, or by changing start codons. The optimization tries to avoid secondary ORFs with more than 50 nucleotides.

2.6.1 Original sequence:

Number of secondary ORFs: 30
 Total length of sec. ORFs: 598
 Number of ORFs with >50nt: 2

2.6.2 Optimized sequence:

Number of secondary ORFs: 24
 Total length of sec. ORFs: 501
 Number of ORFs with >50nt: 2

2.7 Restriction sites

The table lists the unwanted restriction sites contained in the sequence, as well as their positions.

Enzyme	Positions in original sequence	Positions in optimized sequence
HindIII	0	0
NcoI	3	0
NdeI	1	1
NotI	1	1
SacII	0	0
SpeI	1	1
XhoI	2	1

2.8 Cryptic splice sites

The following table shows possible splice sites in the specified sequence. The score is relative to the range between the best-scoring and worst-scoring splice sites in the training set.

2.8.1 Splice sites in original sequence

Type	Position	Relevance
Donor	189	Unlikely
Donor	365	Unlikely
Donor	377	Unlikely
Donor	492	Possible
Donor	640	Possible
Donor	1019	Possible
Donor	1065	Possible
Donor	1077	Possible

2.8.2 Splice sites in optimized sequence

Type	Position	Relevance
Donor	82	Possible
Donor	511	Unlikely
Donor	625	Unlikely
Donor	697	Unlikely
Donor	805	Possible
Donor	874	Possible
Donor	904	Unlikely
Donor	1072	Possible

2.9 AT/GC stretch restrictor

2.9.1 Original sequence

Number of stretches longer than 4 nt: 38

Average AT/GC stretch length: 6.05

2.9.2 Optimized sequence

Number of stretches longer than 4 nt: 25

Average AT/GC stretch length: 6.08

3 Optimized sequence

This is the optimized sequence, ready for copying and pasting into other applications.

```
AAGCT TAAAA AAATG TCTCT CGAGA AGAGG CATAT GACTA GTGAC TCAGG
TTGTG TAATC AATTG GAAAG GAAGG GAGCT TAAGT GCGGT TCTGG TATTT
TTGTA ACCAA CGAAG TCCAT ACGTG GACCG AACAG TACAA ATTTT AGGCT
GATTC GCCAA AAAGA TTGAG CGCTG CTATC GGAAA AGCCT GGGAA GAAGG
AGTCT GCGGT ATCAG ATCTG CCACA AGATT AGAAA ATATT ATGTG GAAGC
AAATC TCAA TGAGC TGAAT CATAT ACTGT TAGAA AATGA CATGA AATTC
ACCGT TGTGG TCGGT GATGC CAATG GAATA CTTGC ACAGG GAAAA AAAAT
GATAA GGCCT CAACC TATGG AGCAC AAATA TTCTT GGAAA TCCTG GGGAA
AAGCC AAGAT CATTG GTGCC GATAT CAAA ACACG ACGTT CATT TTTGAT
GGTCC AGACA CACCG GAATG TCCAG ATGAT CAGAG GGCTT GGAAC ATTTG
GGAAG TTGAA GATTA CGGAT TCGGT ATCTT TACAA CAAAC ATTTG GCTGA
AACTG CGTGA TAGCT ATACT CAAAT GTGCG ATCAT CGTCT GATGT CTGCA
GCAAT TAAGG ACTCA AAAGC TGTTT ACGCA GATAT GGGTT ATTGG ATTGA
ATCAG AAAAG AATGA AACCT GGAAA CTTGC ACGTG CATCT TTCAT AGAAG
TTAAA ACTTG TATTT GGCCG AAAAG TCATA CTTTG TGGTC CAACG GTGTT
CTGGA GTCGG AAATG ATAAT CCCGA AGATC TACGG AGGAC CAATT TCACA
ACACA ACTAT CGTCC AGGTT ATTTT ACTCA GACGG CTGGT CCTTG GCACT
```

TGGGT AAATT GGAAT TGGAT TTTGA TCTTT GTGAA GGTAC AACTG TTGTG
GTGGA CGAGC ATTGC GGTA TCGTG GTCCG AGTTT GAGAA CTACA ACTGT
CACCG GTAAG ATAAT TCATG AATGG TGTTG TAGAA GCTGT ACCTT ACCAC
CTCTG AGATT TAGAG GAGAG GACGG TTGTT GGTAC GGTAT GGAGA TTCGT
CCTGT TAAGG AAAAG GAGGA AAATT TGGTA AGAAG TATGG TGTCT GCCGG
AGGCT CTTCC TGCGC GGCCG CTTGA TAACC ATGG

Created with Leto 1.0 - the dedicated software for gene synthesis and optimized protein expression. To get more information on Leto and download a demo version, visit www.entelechon.com/leto or call Entelechon at +49 941 94 683 60.

**ANEXO A: PARECER DO COMITE DE ETICA EM PESQUISAS COM ANIMAIS
DE EXPERIMENTACAO**

**ANEXO B: PARECER DO COMITE NACIONAL DE ETICA EM PESQUISAS COM
SERES HUMANOS**



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1631/2005

Registro CONEP: 12138 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0010.0.095.000-05

Processo nº 25000.103600/2005-39

Projeto de Pesquisa: "Programa de descoberta de epítopos de células T e produção de anticorpos em larga escala: identificação e avaliação de epítopos de células T --
Subprojeto: Identificação e avaliação de epítopos de células T Coortes Clínicas (projeto 2). Coortes Clínicas Febre Amarela: Avaliação da soroconversão da vacina antiamarilica entre residentes do município do Recife, no período de 2005 a 2009."
Pesquisador Responsável: Dr. Eduardo Maia Freese de Carvalho
Instituição: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ/PE
Área Temática Especial: Cooperação estrangeira.

Objetivos

Avaliar a resposta imunológica de indivíduos submetidos à vacinação antiamarilica (17DD) em Recife-PE, no período de 2005 a 2009.

Sumário

O projeto apresentado faz parte de um grupo de 4 subprojetos apresentados dentro de um projeto denominado-Projeto 2, Coortes Clínicas, realizado no Brasil em conjunto com o NIH e vinculado a um projeto maior subdividido em outros 4 projetos: Programa de descobertas de epítopos de células T e produção de anticorpos em larga escala: identificação e validação de epítopos de células T, coortes clínicas.

Trata-se de uma coorte clínica que tem por objetivo avaliar a resposta imunológica de indivíduos submetidos à vacinação antiamarilica e que possui duas fases de avaliação:

- a) Fase prospectiva: constituída de 230 indivíduos que receberão a vacina antiamarilica e que serão acompanhados imunologicamente por um período de 4 anos;
- b) Fase Retrospectiva: constituída de 40 indivíduos, sendo 20 vacinados há 5 anos e 20 vacinados há 10 anos.

Na fase prospectiva os indivíduos deverão doar 5 amostras de 20 ml de sangue. Uma no momento anterior ao da vacinação, outras a 3 a 6 semanas após e uma vez a cada ano, por 4 anos. Na fase retrospectiva somente uma amostra de 20 ml será colhida dos indivíduos elegidos.

Critérios de elegibilidade: indivíduos de 10 anos ou mais.

Critérios exclusão estão bem definidos: ser alérgico a ovo de galinha; gravidez; imunodeprimidos, portadores de HIV e indivíduos com febre superior ou igual a 38°C.

O projeto apresenta ainda 2 questionários, um para cada fase do estudo. Os mesmos são identificados para que se possa fazer o seguimento dos indivíduos (em anexo). Além disso, dois Termos de Consentimento Livre e Esclarecido fazem parte do projeto, um para cada tipo de sujeito envolvido na fases prospectiva e retrospectiva (em anexo).

Cont. Parecer CONEP 1631/05

O sangue coletado servirá para a separação do soro e para a separação e criopreservação das células T. No soro serão realizadas as pesquisas para anticorpos IgM e IgG. As células congeladas serão guardadas na FIOCRUZ/PE para serem utilizadas posteriormente.

Justificativa para realização do projeto: avaliar a efetividade da vacina antiamarilica uma vez que essa vacina está sujeita a degradação pela temperatura, transporte, manipulação, armazenamento e aplicação.

Sumário do projeto do Projeto anteriormente apresentado a CONEP, nº 11985- Programa de descoberta de epitopos de células T e produção de anticorpos em larga escala: Identificação e avaliação de epitopos de células T coortes clínicas (projeto 2).

Este programa consiste de quatro projetos inter-relacionados: Análises de bioinformática (Projeto 1) que possibilitará o uso de técnicas computacionais avançadas (rede neural artificial e modelo de Markov oculto) de antígenos e variabilidade antigênica que ajudam a expandir a análise para uma variedade de alelos de HLA, identificações de regiões antigênicas promiscuas, epitopos promiscuos de células T e imunológicos "hotspots" para validação em seleção funcional (projeto 3). A coorte de pacientes (projeto 2) focalizará o manejo de pacientes infectados e fornecerá uma série de amostras para o mapeamento funcional (projeto 3) de epitopos de células T. O mapeamento funcional (projeto 3) validará epitopos de células T de candidatos capturados por seleção computacional. A análise será feita *ex vivo* usando sangue periférico de pacientes previamente infectados. Os resultados do mapeamento funcional de epitopos de células T serão, mais adiante, estudados para caracterização da resposta *in vivo* aos epitopos (projeto 4) através do uso de camundongos transgênicos para HLA a fim de conhecer o potencial de epitopos de células T, para o processamento natural e sua aplicabilidade do desenho de vacinas. Os resultados do mapeamento funcional (Projeto 3) e processamento de epitopos (Projeto 4) retomarão ao Projeto 1 para o aperfeiçoamento da eficiência dos epitopos das células T mapeados, e ao Projeto 2 para gerenciamento da coorte de pacientes. Vários ciclos do processo completo serão realizados a fim de maximizar com sucesso a identificação de epitopos de células T e minimizar os custos, como visto anteriormente nos estudos com *P.falciparum*. A principal força desta proposta esta nos itens: a) Acesso a uma única coorte de pacientes, b) capacidade para real acesso, de epitopos de células T naturalmente processadas, c) Combinação de métodos experimentais e computacionais para uma ampla cobertura e descoberta eficiente de epitopos de células T. Os epitopos de células T identificados serão então submetidos ao Banco de dados de Epitopos imunes.

Comentários/Considerações

O subprojeto apresentado este bem escrito e dentro dos critérios da Resolução CNS 196/96. A cooperação estrangeira nessa parte do projeto e apenas como financiador do projeto maior a qual esse subprojeto faz parte.

Não haverá envio de material biológico para o exterior nessa fase e a FIOCRUZ/PE se responsabiliza pela guarda do material.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE está de acordo com a da Resolução CNS 196/96, tendo apenas uma recomendação a ser feita: No item 4 do TCLE dos indivíduos da fase prospectiva e retrospectiva consta que caso a resposta à vacinação não seja satisfatória quer dizer "a vacina não ter pegado" (aspas do texto), o resultado do teste será enviado a ANVISA que poderá entrar em contato

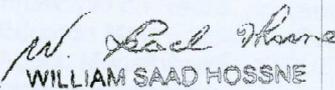
Cont. Parecer CONEP 1631/05

com o indivíduo para dar ao encaminhamento devido. Solicita-se que no lugar da palavra poderá, deve ser garantido ao indivíduo que a ANVISA ou o pesquisador responsável pela pesquisa deverá entrar em contato com o indivíduo para que ele se beneficie do resultado da pesquisa submetendo-se a outra vacinação e posterior análise imunológica.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto com a recomendação acima citada, devendo esta ser acompanhada pelo CEP, para posterior início da pesquisa.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 22 de setembro de 2005.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS