

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Júlia de Souza Reis

**ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM
CÉLULAS EUCARIONTES E SUAS APLICAÇÕES PARA O DIAGNÓSTICO
DE ARBOVIROSES.**

Belo Horizonte

2024

Júlia de Souza Reis

**ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM
CÉLULAS EUCARIONTES E SUAS APLICAÇÕES PARA O DIAGNÓSTICO
DE ARBOVIROSES.**

Dissertação de Mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação do
Departamento de Bioquímica e
Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como parte dos pré-
requisitos para obtenção do título de
mestre em bioquímica e imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Santuza Maria
Ribeiro Teixeira

Coorientador: Prof Dr. Flávio G. da
Fonseca

Belo Horizonte

2024

043

Reis, Júlia de Souza.

Estratégias para produção de proteínas recombinantes em células eucariontes e suas aplicações para o diagnóstico de arboviroses [manuscrito] / Júlia de Souza Reis. – 2024. 144 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Santuza Maria Ribeiro Teixeira. Coorientador: Flávio G. da Fonseca.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e Imunologia. 2. Infecções por Arbovirus. 3. Testes Sorológicos. 4. Expressão Gênica. 5. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 6. Antígenos Virais. I. Teixeira, Santuza Maria Ribeiro. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



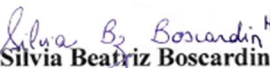
Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

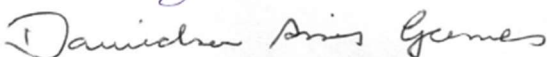


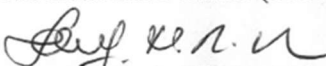
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JULIA DE SOUZA REIS. Aos vinte e um dias do mês de março de 2024 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom” e no Auditório do BH-TEC, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Estratégias para produção de Proteínas Recombinantes em Células Eucariontes e suas aplicações para o diagnóstico de Arboviroses”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Silvia Beatriz Boscardin (Universidade de São Paulo), aprovada; Dr. Dawidson Assis Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

☒ APROVADA
☐ REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 21 de março de 2024.


Dra. Silvia Beatriz Boscardin (Universidade de São Paulo)


Dr. Dawidson Assis Gomes (UFMG)


Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo folego de vida, pela Presença, que nos momentos mais difíceis trouxe a paz que excede a todo entendimento, pelo amor, que sempre encheu o meu coração e pela certeza, de que eu, nem por um segundo, estive sozinha.

À banca examinadora, pela disponibilidade e por contribuírem para esse trabalho.

À minha orientadora, Professora Dra. Santuza Teixeira, pelos conselhos orientações e pela exigência, que me levaram além. Por fazer de mim uma profissional melhor, mais crítica, mais técnica e mais sensata. Agradeço por toda confiança em mim depositada, ao me entregar um projeto de tamanha relevância.

Ao Professor Dr. Flávio Fonseca, meu co-orientador, por toda confiança depositada em meu trabalho e por todas as dicas, conselhos e orientações que levaram a conclusão desse projeto.

À Dra. Caroline Junqueira, por todas as discussões científicas e por toda disponibilidade em aconselhar e orientar a respeito dos experimentos com Lentivírus.

À Dra Karine Lourenço, por toda troca de conhecimento e apoio durante esse projeto, pelas palavras inspiradoras, reconfortantes, por todos os sorrisos e pelos momentos incríveis, que compartilhamos ao longo dessa trajetória.

À Dra. Flávia Bagno, que prontamente me auxiliou em todos os experimentos de ELISA permitindo que os dados desse projeto fossem fechados de forma muito mais completa. Agradeço pela paciência com uma iniciante em testes sorológicos e por cada conselho.

Aos pesquisadores associados, Professores Dra. Ana Paula Fernandes e Dr. Ricardo Gazzinelli, agradeço pela oportunidade. É uma grande honra fazer parte dessa equipe e atuar num centro de pesquisa responsável pelo desenvolvimento de produtos capazes de verdadeiramente impactar a saúde no nosso país.

Aos amigos Cid, Mateus e Hugo, definitivamente não teria conseguido sem vocês, vocês foram o alívio cômico dos dias turbulentos, os companheiros de experimentos e certamente os membros das melhores discussões científicas.

Aos meus pais, Edene e Ricardo, a minha base, para quem desejo todos os dias ser orgulho. Tudo isso certamente foi por vocês, que me amaram, acreditaram e investiram tanto em mim. Investiram tempo e paciência na filha recorrentemente estressada, cuja cabeça estava sempre distraída por múltiplas preocupações. Vocês não mediram esforços em me proporcionar todas as condições para alcançar os meus sonhos. Eu amo vocês infinitamente e não tenho dúvidas de que fui uma flecha bem lançada pelas suas mãos.

Ao Lucas Gabriel, meu amor, pelo carinho e paciência. Você é o melhor presente que ganhei nessa trajetória. Obrigada por me fazer sorrir e mesmo sem entender muitas das palavras que eu dizia, ouvir atentamente todos os meus desabaços sobre experimentos bem ou mal-sucedidos, pelos chocolates, presentes e mimos, pela companhia e por acreditar tanto em mim.

Ao meu irmão Lucas, que nunca mediu esforços para me ajudar no que fosse preciso, meu companheiro e cúmplice em tantas etapas.

À minha família e amigos, minha avó Carmelita, minhas tias Edna, Vilma e Carmem, meus pastores Sandra e Itamar, meu primo Marcos Vinícius, pessoas que nunca mediram esforços para me ajudar no que fosse preciso, que oraram por mim, choraram comigo e hoje podem se alegrar com mais essa vitória.

Aos ausentes, meus avós Otávio e Belovina e minha tia Marli, vocês não presenciaram essa conquista, mas sei que vibrariam com ela.

Aos demais pesquisadores, técnicos e toda equipe do CT vacinas, pela cumplicidade e acolhimento ao longo desse projeto, por cada discussão científica e cada momento de descontração, que tornaram a rotina mais leve.

Por fim, sou grata a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse projeto.

“Ainda que tivesse o dom de profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência, ainda que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, e não tivesse o amor, nada seria”.

1 Coríntios 13:2

RESUMO

Existem dois principais tipos de testes diagnósticos para arboviroses, testes sorológicos, que detectam a presença de anticorpos contra o vírus ou antígenos virais, e testes moleculares, que detectam a presença do material genético do vírus. A produção de testes sorológicos para essas doenças apresenta limitações: as proteínas recombinantes desses vírus são difíceis de expressar em células eucarióticas, enquanto as proteínas recombinantes produzidas em sistemas procarióticos mostraram pouca especificidade e/ou sensibilidade. Quando produzidas em células eucariontes, essas proteínas apresentam modificações pós-traducionais importantes para a interação antígeno-anticorpo e em consequência, na sensibilidade do teste, o que não ocorre em células procariontes. O presente trabalho descreve a produção e purificação da proteína E dos sorotipos 1 a 4 de DENV e da proteína E₂ de CHIKV em células de mamífero e em bactérias. As sequências das proteínas foram modificadas excluindo o domínio transmembrana e adicionando um peptídeo sinal à porção N-terminal para permitir a secreção. Além disso, a sequência consenso Kozak foi incorporada no vetor de expressão, para otimizar a tradução do mRNA em células eucariontes. O plasmídeo pcDNA 3.1 foi inicialmente empregado para expressão transiente, posteriormente, antibióticos foram utilizados para selecionar um pool de células capazes de expressar de forma estável o gene clonado no plasmídeo. Alternativamente, células eucariontes foram transduzidas com vetores lentivirais para estabelecer linhagens celulares de expressão estável. A proteína E₂ do CHIKV, foi produzida em células EXPI utilizando vetor plasmidial e após a purificação, esta foi utilizada em ensaios de ELISA com soros de indivíduos infectados e não infectados. Esses ensaios resultaram em altos índices de sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos IgM e IgG. Para fins de comparação, a proteína E₂ do CHIKV foi também produzida em *E. coli* e testada em ELISA demonstrando um potencial semelhante para detecção de IgG porém inferior para detecção de IgM. O trabalho demonstrou que linhagens estavelmente transfectadas com pcDNA 3.1 seguido de seleção ou transduzidas por lentivírus são capazes de expressar as proteínas de interesse. Ensaios de ELISA sugerem que proteínas produzidas em células eucariontes tem melhor capacidade para detecção de anticorpos do tipo IgM e

IgG do que as produzidas em células procariontes. Por meio da avaliação de reconhecimento por anticorpos no soro de um número maior de indivíduos infectados, esses antígenos estão sendo empregados na prototipagem de testes de diagnóstico nos formatos de ELISA e teste rápido imunocromatográfico.

Palavras-chave: Vírus da Dengue; Diagnóstico; arboviroses; Proteína de Envelope; Proteínas recombinantes; Células eucariontes.

ABSTRACT

There are two main types of diagnostic tests for arboviruses: serological tests, which detect the presence of antibodies against the virus or viral antigens, and molecular tests, which detect the presence of the virus's genetic material. The production of serological tests for these diseases presents limitations: recombinant proteins from these viruses are challenging to express in eukaryotic cells, while those produced in prokaryotic systems have shown limited specificity and/or sensitivity. When produced in eukaryotic cells, these proteins undergo post-translational modifications that can interfere with the antigen-antibody interaction and consequently, the sensitivity of the diagnostic test, which does not occur in prokaryotic cells. This study describes the production and purification of the E protein from serotypes 1 to 4 of DENV and the E₂ protein from CHIKV in mammalian cells and bacteria. The protein sequences were modified by excluding the transmembrane domain and adding a signal peptide to the N-terminal portion to allow secretion. Additionally, the Kozak consensus sequence was incorporated into the expression vector to optimize mRNA translation in eukaryotic cells. The pcDNA 3.1 plasmid was initially used for transient expression. Subsequently, antibiotics were used to select a pool of cells capable of stably expressing the cloned gene in the plasmid. Alternatively, eukaryotic cells were transduced with lentiviral vectors to establish stable cell lines of expression. The CHIKV E₂ protein was produced in EXPI cells using a plasmid vector, and after purification, it was used in ELISA assays with sera from infected and uninfected individuals. These assays resulted in high sensitivity and specificity rates for the detection of IgM and IgG antibodies. For comparison purposes, the CHIKV E₂ protein was also produced in *E. coli* and tested in ELISA, demonstrating similar potential for IgG detection but poorer performance for IgM

detection compared to proteins produced in eukaryotic cells. The study demonstrated that cell lines stably transfected with pcDNA 3.1 followed by selection or transduction by lentiviruses are capable of expressing the proteins of interest. ELISA assays suggest that proteins produced in eukaryotic cells have better capacity for IgM and IgG antibodies detection than those produced in prokaryotic cells. Through the evaluation of antibody recognition in the serum of a larger number of infected individuals, these antigens are being employed in the prototyping of diagnostic tests in ELISA and imunocromatografic rapid test formats.

Keywords: Dengue Virus; Diagnosis; Arboviruses; Envelope Protein; Recombinant Proteins; Eukaryotic Cells.

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Arboviroses	15
3.2 Histórico das arboviroses no Brasil	16
3.3 Dengue	17
3.3.1 Epidemiologia	17
3.3.2. Manifestações clínicas e sintomatologia	19
3.3.3 Partícula viral e ciclo replicativo	22
3.3.4. Resposta imune e Patogenia	24
3.3.5 Proteína de Envelope e 80% de E	26
3.4 Diagnóstico de DENV	27
3.5 CHIKV	28
3.5.1 Epidemiologia	29
3.5.2 Partícula viral e ciclo replicativo	30
3.5.3. Resposta imune e patogênese	32
3.5.4 Proteína E ₂	34
3.6 Diagnóstico de CHIKV	35
3.7 Sistemas de expressão de proteínas recombinantes	36
3.7.1 Sistemas de expressão em organismos procariotes	37
3.7.2 Sistemas de expressão em organismos eucariontes	38
3.8 Expressão transiente x Expressão estável	39
3.8.1 Vetor plasmidial aplicado à expressão estável	41
3.8.2 Vetor viral (Lentivírus)	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Construção dos genes	43
4.1.1 Sequências consenso para os genes de interesse	43
4.1.2 Genes para expressão em células de mamífero	43
4.2 Clonagem e confirmação de identidade dos plasmídeos	44
4.2.1 Transformação	44
4.2.2 Digestão enzimática	44
4.2.3 Eletroforese em gel de agarose.	45
4.2.4 Subclonagem de plasmídeos por ligação dos produtos de digestão	45

4.3 Cultivo celular.....	45
4.3.1 HEK293T	46
4.3.2 EXPI293.....	46
4.4 Expressão transiente em células HEK293T e EXPI293.....	47
4.4.1 Transfecção de células HEK 293T	47
4.4.2 Transfecção de células EXPI293	47
4.5 Expressão estável utilizando pcDNA 3.1(+) em EXPI293.....	48
4.6 Expressão estável utilizando vetor viral.....	50
4.6.1 Vetor viral e plasmídeos associados	50
4.6.1.1 pLVX puro	50
4.6.1.2 pCMV.VSV.G.....	52
4.6.1.3 psPAX ₂	53
4.6.2 Montagem do vetor viral em HEK293T	53
4.6.3 Montagem do vetor viral em EXPI	54
4.6.4 Concentração das partículas virais utilizando filtro Amicon	54
4.6.5 Transdução	55
4.6.5.1 Transdução de células HEK293T.....	55
4.6.5.2 Transdução de células EXPI296	55
4.7 PCR	55
4.8 Concentração dos sobrenadantes após a expressão da proteína.	56
4.9 Expressão da proteína E ₂ de CHIKV em BL21 e purificação por cromatografia de afinidade.....	56
4.10 SDS-PAGE.....	57
4.11 Western Blot	58
4.12 Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade em colunas de níquel	59
4.13 ELISA	59
4.14 Análises dos resultados de ELISA	60
5. RESULTADOS	62
5.1 Síntese dos genes E de DENV 1-4 e E ₂ de CHIKV	62
5.2 Clonagem do pcDNA 3.1 + Genes de interesse e confirmação de identidade dos plasmídeos por restrição enzimática.....	68
5.3 Expressão transiente em células HEK293T da proteína de Envelope dos sorotipos 1 e 2 do vírus da Dengue.....	72
5.4 Expressão transiente em células EXPI293 da proteína de Envelope dos sorotipos 1-4 do vírus da Dengue.....	74
5.5 Clonagem do pcDNA 3.1 + Genes de interesse após otimização de códons e confirmação de identidade dos plasmídeos por restrição enzimática	76

5.6 Expressão transiente em células EXPI293 da proteína de Envelope dos sorotipos 1-4 do vírus da Dengue utilizando pcDNA3.1 após otimização de códons das sequências gênicas.	78
5.7 Expressão estável sob pressão seletiva da proteína de Envelope dos sorotipos 1-4 do vírus da Dengue em células EXPI293 utilizando pcDNA3.1 após otimização de códons das sequências gênicas.....	82
5.8 Estratégia alternativa para obtenção de linhagens estavelmente transduzidas com vetor viral e confirmação de identidade dos plasmídeos para montagem do lentivírus.	84
5.9 Avaliação da estratégia de transdução com vetor viral (Lentivírus) utilizando a proteína fluorescente vermelha (RFP).	84
5.10 Clonagem dos plasmídeos pLVX puro para transferência do gene da proteína de envelope dos 4 sorotipos do vírus da Dengue.	89
5.11 Transfecção com plasmídeos contendo sequências codificadoras da proteína de envelope dos sorotipos 1 a 4 do vírus da Dengue em células HEK293T para geração do vetor lentiviral. 90	
5.12 Análise da integração dos genes da proteína E de DENV1, 2 e 4 após a transdução com vetor lentiviral	90
5.13 Avaliação da expressão das proteínas de interesse em células HEK293T após a transdução com vetor lentiviral	91
5.14 Avaliação da estabilidade dos genes na ausência de pressão seletiva	93
5.15 Expressão estável da proteína de envelope dos 4 sorotipos do vírus da Dengue em células EXPI 293 por meio de transdução com vetor lentiviral.....	94
5.16 Purificação da proteína de envelope dos 4 sorotipos do vírus da Dengue expressa de forma estável em células EXPI 293 após transdução com vetor viral.....	97
5.18 Expressão transiente da proteína E ₂ do vírus Chikungunya em células EXPI293 utilizando pcDNA3.1.....	100
5.19 Avaliação da aplicação da proteína E ₂ de CHIKV expressa em células EXPI293 no diagnóstico por ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG anti CHIKV em amostras de soro humano.	102
5.20 Expressão estável da proteína E2 de Chikungunya vírus utilizando pcDNA3.1 sob pressão seletiva e purificação de novo lote.	106
5.21 Produção e purificação da proteína E2 de Chikungunya vírus em <i>Escherichia coli</i> BL21 .	109
5.22 ELISA comparativo com a proteína E2 de Chikungunya vírus, produzida em BL21 e em EXPI293.....	111
5.23 Expressão estável da proteína E2 de CHIKV utilizando o pcDNA3.1 sob pressão seletiva com G418	118
5.24 Purificação da proteína E2 de CHIKV expressa de forma estável utilizando o pcDNA3.1 sob pressão seletiva com G418	120
6. DISCUSSÃO	122
7. CONCLUSÃO	129
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

1. JUSTIFICATIVA

De acordo com o ministério da saúde, as Arboviroses são doenças epidêmicas no Brasil, que registram casos ao longo de todo ano, mas apresentam sazonalidade de surtos durante os períodos quentes e chuvosos, especialmente pela correlação do ciclo de vida do vetor que transmite essas doenças. Dentre elas, destacam-se Dengue e Chikungunya como responsáveis pelo maior número de casos.

O curso final da doença para benigna ou grave, dependendo da forma como se apresenta e das medidas adotadas para com os pacientes. Nesse contexto, a primeira etapa para correta adoção de medidas que levarão a um desfecho menos prejudicial, consiste num diagnóstico preciso e precoce.

O diagnóstico molecular é mais caro e demanda estrutura laboratorial e conhecimento técnico, já os testes sorológicos exigem insumos, que podem ser de difícil obtenção. Os testes atualmente disponíveis contam em sua maioria com tecnologia importada e em alguns casos ainda apresentam baixa sensibilidade e especificidade. Proteínas recombinantes produzidas em organismos procariontes demonstram baixa eficiência quando aplicadas à detecção de anticorpos do tipo IgM, que sinaliza fase inicial da doença.

Nesse contexto, o desenvolvimento de testes sorológicos capazes de detectar com alta sensibilidade e especificidade anticorpos do tipo IgM e IgG contra os arbovírus, é essencial. A utilização de proteínas recombinantes produzidas em células de organismos eucariontes tem potencial para melhorar a sensibilidade e especificidade desses testes. A prototipagem de testes utilizando tecnologia Brasileira, e sua produção em território nacional os torna mais acessíveis, permitindo o diagnóstico precoce dessas doenças no país, diminuindo a subnotificação e auxiliando na diminuição das taxas de morbidade e mortalidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Testar diferentes estratégias para obtenção de linhagens de células de mamífero expressando as proteínas do Envelope dos sorotipos 1-4 do vírus da *Dengue* e a proteína E₂ do vírus da febre *Chikungunya* e avaliar o uso desses antígenos recombinantes em testes de diagnóstico.

2.2 Objetivos específicos

- a) Construir, a partir de análises *in silico* e clonagem, plasmídeos pcDNA3.1 contendo o gene codificador dessas proteínas para transfecção e expressão de forma transiente e estável em células de mamífero em cultura;
- b) Obter linhagens de expressão estável por meio da construção de lentivírus contendo o gene codificador da proteína E dos sorotipos 1 a 4 do vírus da Dengue e da proteína E₂ do vírus *Chikungunya* (CHIKV);
- c) Expressar e purificar a proteína E dos sorotipos 1 a 4 do vírus da Dengue nas plataformas de expressão HEK293 e EXPI293;
- d) Expressar e purificar a proteína E₂ do CHIKV a partir de células EXPI293 transfectadas de forma transiente e estável;
- e) Avaliar o reconhecimento dessas proteínas recombinantes por anticorpos presentes no soro de pacientes por meio de Western-Blot e ELISA;
- f) Expressar em *E. coli* e purificar a proteína E₂ do CHIKV;
- g) Comparar o reconhecimento da proteína recombinante E₂ do CHIKV obtida em células EXPI293 e em bactéria por anticorpos presentes no soro de pacientes.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Arboviroses

O termo "arbovirose" é uma abreviação de "*arthropod-borne viruses*" (do inglês, vírus transmitidos por artrópodes) e consiste em uma família diversificada de patógenos transmitidos pela picada de artrópodes hematófagos (WEAVER, BARRETT, 2004). Duas espécies de mosquitos, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, estão entre os vetores arbovirais mundialmente mais proeminentes. Essas doenças podem afetar tanto humanos quanto outros animais, e sua distribuição geográfica está relacionada à presença desses vetores transmissores (VIGLIETTA *et al.*, 2021). Dentre os patógenos estão membros das famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Phenuviridae*, *Peribunyaviridae*, *Reoviridae*, *Asfarviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Poxviridae* (VARGHESE, DE SILVA, MILLAR, 2023).

O comércio de escravos africanos para as Américas, a partir do século XVI, é descrito na literatura como responsável pelos primeiros registros dessas doenças no "Novo Mundo", com casos do vírus da febre amarela e do vírus da dengue (GOULD *et al.* 2003). Desde então, muitos outros arbovírus emergiram de seus reservatórios silvestres e dispersaram-se globalmente devido a diversos fatores. Os aumentos da densidade populacional, do desmatamento e da urbanização, além do desenvolvimento de sistemas de transporte globais, provocaram alterações nos padrões de interações vírus-vetor-hospedeiro durante os últimos séculos (KRAEMER, REINER, BRADY, 2019).

O ciclo de infecção dos arbovírus requer transmissão biológica artrópode-vertebrado-artrópode. Em que há um hospedeiro no qual se replicam, que pode ser humano, e um vetor artrópode, para transmissão a outros organismos. Os mosquitos-fêmea ingerem o vírus do sangue de um animal infectado e ao picar outro animal, o mosquito transfere o vírus através da saliva para o novo hospedeiro (WEAVER, BARRETT, 2004). A transmissão entre os hospedeiros vertebrados por meio do contato entre fluidos apresenta um menor impacto na disseminação dessas doenças (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019).

A maioria das infecções arbovirais é assintomática ou apresenta uma doença semelhante à influenza. No entanto, vários alfavírus e flavivírus transmitidos por mosquitos são importantes patógenos humanos e podem causar uma variedade de sintomas, desde doenças febris leves até complicações graves e potencialmente fatais (MACKENZIE, GUBLER, PETERSEN, 2004). A morbidade e mortalidade associadas a essas doenças podem variar dependendo do vírus específico, da região geográfica, das condições de saúde dos hospedeiros e das medidas de controle, diagnóstico e tratamento implementadas (GOULD *et al.* 2017).

Existem mais de 500 arbovírus identificados ao redor do mundo, dentre esses, pelo menos 150 demonstram capacidade de causar doenças (MADAWELL, 2020). Dengue, *Chikungunya*, Zika e Febre Amarela estão entre as doenças mais prevalentes, com cerca de 96 milhões de casos de dengue, 693.000 casos de febre chikungunya, 500.000 casos de Zika e 130.000 casos de febre amarela registrados anualmente (GIRARD *et al.*, 2020).

3.2 Histórico das arboviroses no Brasil

Essas doenças são, originariamente, zoonoses: doenças de animais, que eventualmente acometem humanos. No Brasil, a Mata Atlântica e a floresta Amazônica são os maiores reservatórios de arboviroses (OSCAR JUNIOR & ASSIS MENDONÇA, 2021). Os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* membros da família *Culicidae*, pertencentes ao gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia* são os principais responsáveis pela transmissão das arboviroses dengue, chikungunya, Zika e Febre Amarela. Esse vetor encontra-se amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais, e por isso pode ser encontrado em todo território brasileiro. (MARCONDES; XIMENES, 2016).

A primeira descrição de uma epidemia confirmada por arboviroses no Brasil foi de febre amarela em Pernambuco, em 1685, vinda possivelmente da região do golfo do México. Na década de 1950 o mosquito *A. aegypti* foi erradicado do país, mitigando os casos dessas doenças, entretanto, o vetor foi reintroduzido na década de 1970 e em 1982 foi registrada uma nova epidemia de arbovirose em Boa Vista, Roraima, dessa vez causada pelo vírus da Dengue. (SILVA & ANGERAMI, 2008).

Entre os anos de 2013 e 2020, o Brasil registrou o maior número de casos absolutos de arboviroses da América Latina, de acordo com os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Já entre os anos de 2019 e 2021 houve uma diminuição no registro e notificação de casos dessas doenças. Essa diminuição está provavelmente associada a um colapso no SUS devido à pandemia do novo coronavírus SARS-CoV-2 e a diminuição do diagnóstico diferencial de arboviroses. (SOUZA, *et al.*, 2020). Nos anos de 2022 e 2023 novas epidemias voltaram a ser registradas. Em 2024, é esperado um dos maiores surtos de Dengue e Chikungunya dos últimos anos, já havendo sido registrados mais de 700 mil casos prováveis até o mês de fevereiro. (PAHO/WHO)

3.3 Dengue

A Dengue é a arbovirose mais prevalente no Brasil e no mundo. É uma doença viral aguda e sistêmica provocada por um vírus de RNA fita simples sentido positivo (ssRNA+). Esse vírus é membro do gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* e apresenta quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4). Cada um desses sorotipos tem interações diferentes com os anticorpos do soro sanguíneo humano (HASAN *et al.*, 2016).

3.3.1 Epidemiologia

Os primeiros relatos da doença datam dos anos 1600. Epidemias com sintomatologia semelhante à dengue foram descritas em diferentes locais do mundo, como Índia Ocidental (1635) e América Central (1699). A etiologia viral e a transmissão por mosquitos, entretanto, só foram determinadas no século XX (MURRAY *et al.*, 2013). Durante o século XIX, a dengue era considerada capaz de provocar epidemias, porém com longos intervalos. No entanto, devido a múltiplos fatores, como variações climáticas, disseminação do vetor e aumento da mobilidade urbana, ocorreram mudanças drásticas neste padrão (KRAEMER, REINER, BRADY, 2019).

Nos últimos 50 anos, a sua incidência aumentou cerca de 30 vezes, com surtos significativos ocorrendo em todo o mundo. Estima-se que a dengue já seja

endêmica em pelo menos 112 países e cause cerca de 390 milhões de infecções por ano, com aproximadamente 50,4 milhões de casos sintomáticos e cerca de 13.500 mortes. Um custo de 8,9 bilhões de dólares para a economia global. (SHEPARD et al., 2016; KUMAR ROY & BHATTACHARJEE, 2021).

No Brasil, até o mês fevereiro, já foram registrados mais de 680 mil casos de dengue no ano de 2024, mais de 5.500 casos de dengue grave e/ou com sinais de alarme, de acordo com o SINAN (Sistema de informação de agravos de notificação). Os gráficos abaixo demonstram os dados epidemiológicos referentes aos anos de 2023 e 2024. (Gráfico 1)

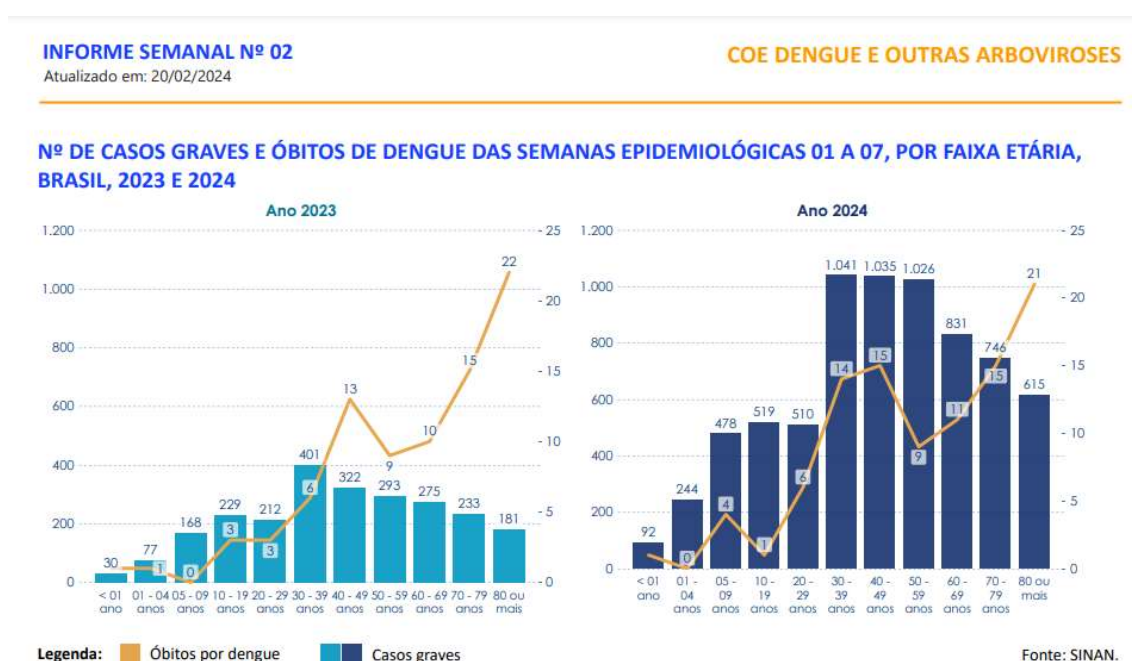
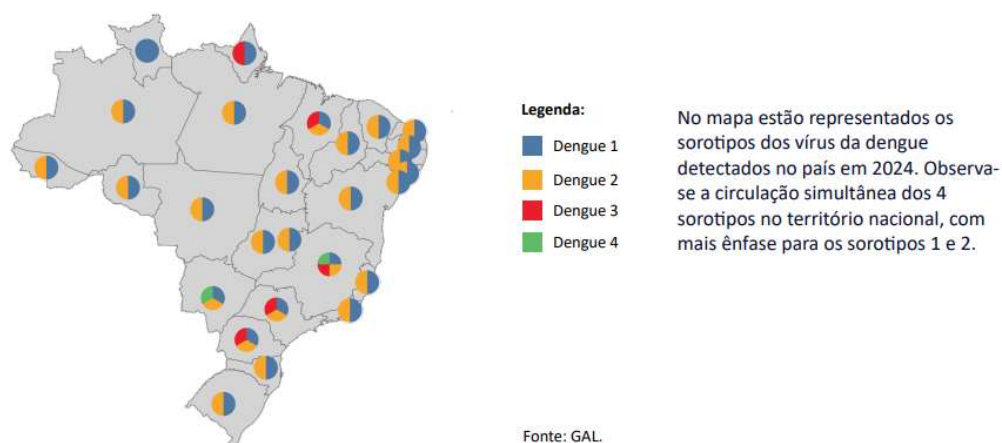


Gráfico 2 – Números de casos graves e óbitos de Dengue por faixa etária no Brasil em 2023 e 2024.

Os dados epidemiológicos também sugerem a circulação dos 4 sorotipos simultaneamente no país no ano de 2024, de acordo com os dados de exames laboratoriais emitidos pelo sistema gerenciador de ambiente hospitalar – GAL da Fundação Ezequiel Dias (Gráfico 2).

MAPA DE SOROTIPOS DE VIRUS INDICADOS PARA DENGUE, POR UF, BRASIL, 2024



O gráfico e o mapa são baseados em dados dos exames laboratoriais e não em casos individuais ou em notificações. Uma mesma pessoa pode ter feito mais de um exame. Dados preliminares, sujeitos a alterações.

Gráfico 2 – Mapa de sorotipos do vírus da dengue indicados por unidade da federação em 2024

3.3.2. Manifestações clínicas e sintomatologia

As manifestações clínicas dessa arbovirose podem incluir febre, dores de cabeça, dores no corpo, prostração, erupções cutâneas, linfadenopatia e leucopenia. A apresentação pode variar desde formas leves até as mais graves, que podem levar à morte por choque, falta de ar, sangramento intenso e/ou complicações graves nos órgãos (HASAN S et al. 2016).

Atualmente, ainda não estão disponíveis medicamentos específicos para o tratamento de dengue e dengue grave (PALANICHAMY, ST JOHN & RATHORE, 2023), todavia a detecção precoce e o acesso a cuidados médicos adequados são capazes de reduzir as taxas de mortalidade para abaixo de 1% (KUMAR ROY & BHATTACHARJEE, 2021).

Algumas vacinas contra a doença já foram aprovadas por agências sanitárias ao redor do mundo ou encontram-se em processo de avaliação por meio de testes clínicos. Dentre elas, esta a QDenga (TAK-003) desenvolvida pela Takeda Vaccines (Cambridge, MA, EUA), uma vacina tetravalente que utiliza a plataforma de vírus quiméricos vivos e atenuados contra os 4 sorotipos de DENV (WILDER-SMITH, 2024). Essa vacina já foi aprovada pela ANVISA e está disponível no SUS de acordo com a resolução – RE N°661, de 2 de março

de 2023 (disponível em: [HTTP://WWW.IN.GOV.BR/WEB/DOU/-/RESOLUCAO-RE-N-661-DE-2-DE-MARCO-DE-2023-467449608](http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-re-n-661-de-2-de-marco-de-2023-467449608)). Outra vacina com resultados promissores em testes clínicos de fase 3 é a vacina desenvolvida pelo Instituto Butantan. Essa vacina também utiliza a plataforma de vírus vivo atenuado e apresentou eficácia de 79,6% em testes preliminares, entretanto ainda é preciso finalizar os ensaios clínicos e passar pelo processo regulatório antes de ser disponibilizada para a população (KALLÁS *et al.*, 2024). Apesar dos avanços, a circulação dos diferentes sorotipos e os possíveis eventos de aumento dependente de anticorpos (ADE) dificultam o processo de desenvolvimento e restringem menores grupos, que podem receber esses imunizantes (NANAWARE *et al.*, 2021)

A recuperação após a infecção por um determinado sorotipo fornece imunidade duradoura contra o ele, entretanto, a imunidade cruzada para os outros sorotipos é apenas parcial e temporária (RICO-HESSE R, 2003). Infecções subsequentes aumentam o risco do desenvolvimento de dengue grave, isso pode ser associado a um mecanismo denominado como ADE (do inglês *Antibody dependent enhancement* – aumento dependente de anticorpos) (KATZELNICK *et al.*, 2017).

As proteínas do invólucro do capsídeo, do envelope (E) e da pré-membrana (prM) são responsáveis pela fixação, entrada e maturação do vírus. Embora todos os sorotipos estejam intimamente relacionados, existe um grau significativo de diversidade de sequências que codificam a expressão de suas proteínas. Como resultado, um subconjunto de IgGs que têm como alvo proteínas virais de um sorotipo pode reagir de forma cruzada com as de outros sorotipos e exibir uma função neutralizante fraca, essa neutralização ineficaz é associada o fenômeno denominado ADE (NARAYAN & TRIPATHI, 2021).

Apesar de não haver consenso entre a comunidade científica sobre a ocorrência desse fenômeno e os mecanismos associados a ele, algumas publicações sugerem que a ligação de anticorpos insuficientes para neutralizar o DENV pode resultar numa maior captação de viriões imaturos pelos fagócitos (via extrínseca). Nos fagócitos, a supressão de uma resposta pró-inflamatória e a indução de uma resposta imune do tipo Th2 podem aumentar ainda mais a

replicação viral (via intrínseca), causando produção excessiva de citocinas (TEO *et al.*, 2023; YAMANAKA *et al.*, 2021).

A figura abaixo demonstra esses possíveis mecanismos pelos quais o ADE ocorre.

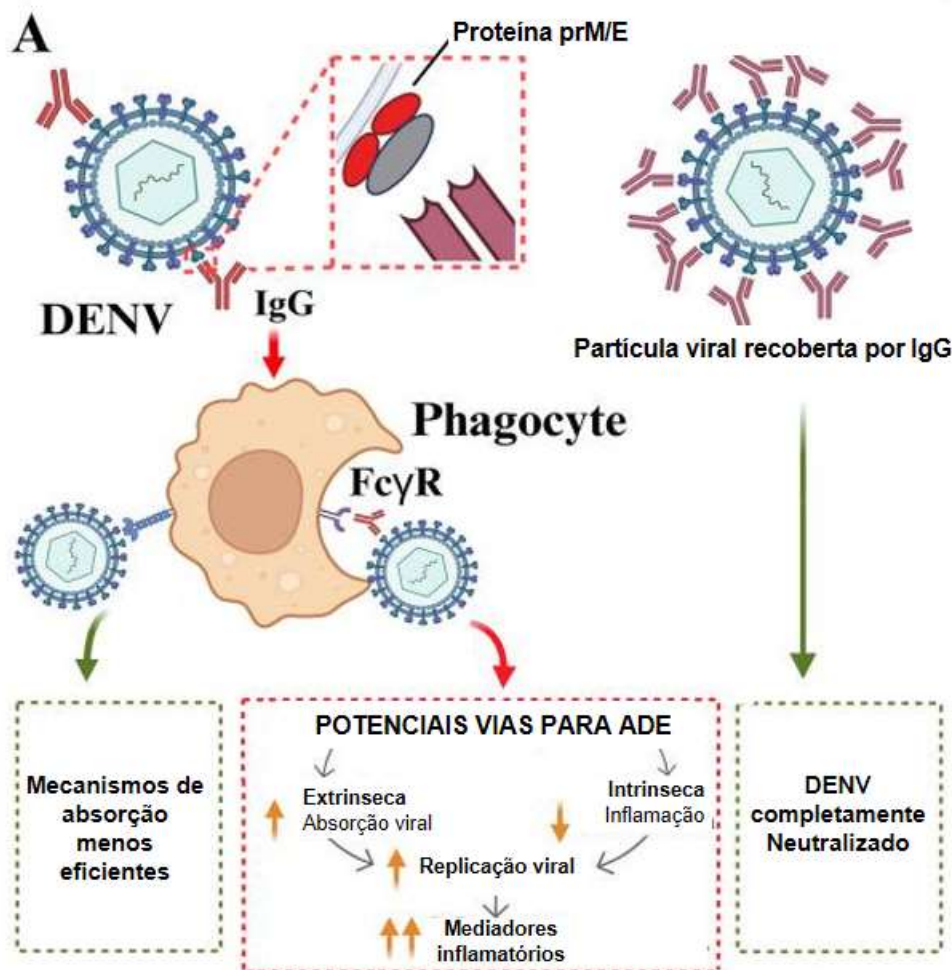


Figura 1 – ADE (do inglês *Antibody dependent enhancement* – aumento dependente de anticorpos). Anticorpos IgG anti-DENV podem se ligar a antígenos de DENV, incluindo proteínas PrM e E, o que promove a interação com FcγRs, como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), expressos por fagócitos. Quando estes anticorpos são insuficientes para neutralizar o DENV, isto pode resultar numa maior captação de viriões imaturos pelos fagócitos (via extrínseca). Nos fagócitos, a supressão de uma resposta pró-inflamatória e a indução de uma resposta imune do tipo Th2 podem aumentar ainda mais a replicação viral (via intrínseca) e, subsequentemente, causar produção excessiva de citocinas. Esse processo é denominado aprimoramento dependente de anticorpos. Quando IgGs neutralizantes anti-DENV estão presentes em níveis elevados, o DENV é totalmente neutralizado e patologias graves podem ser evitadas. Fonte: Adaptado de TEO *et al.*, 2023

3.3.3 Partícula viral e ciclo replicativo

Como os outros vírus, o vírus da dengue é uma estrutura microscópica incapaz de se replicar sem a maquinaria celular de um organismo hospedeiro. Sua estrutura é icosaédrica, contendo o genoma viral de RNA fita simples de sentido positivo (ssRNA+), que codifica a expressão de 10 proteínas (METZ *et al.*, 2018). É um vírus envelopado e com um nucleocapsídeo icosaédrico coberto pela bicamada lipídica. Após a adsorção na célula hospedeira, o vírus da dengue sequestra sua maquinaria para replicar o genoma de RNA viral e sintetizar as proteínas virais (MURUGESAN & MANOHARAN, 2021).

O genoma do DENV de tem aproximadamente 11 kb e pode funcionar como RNAm. Por isso, semelhante aos RNAm dos eucariontes, existem regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3' flanqueando a região codificadora. O cap 5' tipo I serve como um local de iniciação para a tradução, enquanto a extremidade 3' não possui a cauda poli-A e, em vez disso, possui uma haste-alça. A ORF codifica uma poliproteína precursora de 10 proteínas maduras. O processamento e clivagem desta poliproteína durante e após o processo de tradução culmina na síntese de três proteínas estruturais e sete não estruturais. As proteínas estruturais são de Capsídeo (C), Envelope (E), Pré-Membrana (prM) – envolvidas na formação de nucleocapsídeo, formação de membrana e maturação do virion. As proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 possuem diversas atividades enzimáticas que podem apresentar múltiplos papéis em um ciclo infeccioso (NANAWARE *et al.*, 2021). A figura 2 representa esquematicamente a partícula viral e genoma viral, codificando expressão de proteínas estruturais e não estruturais.

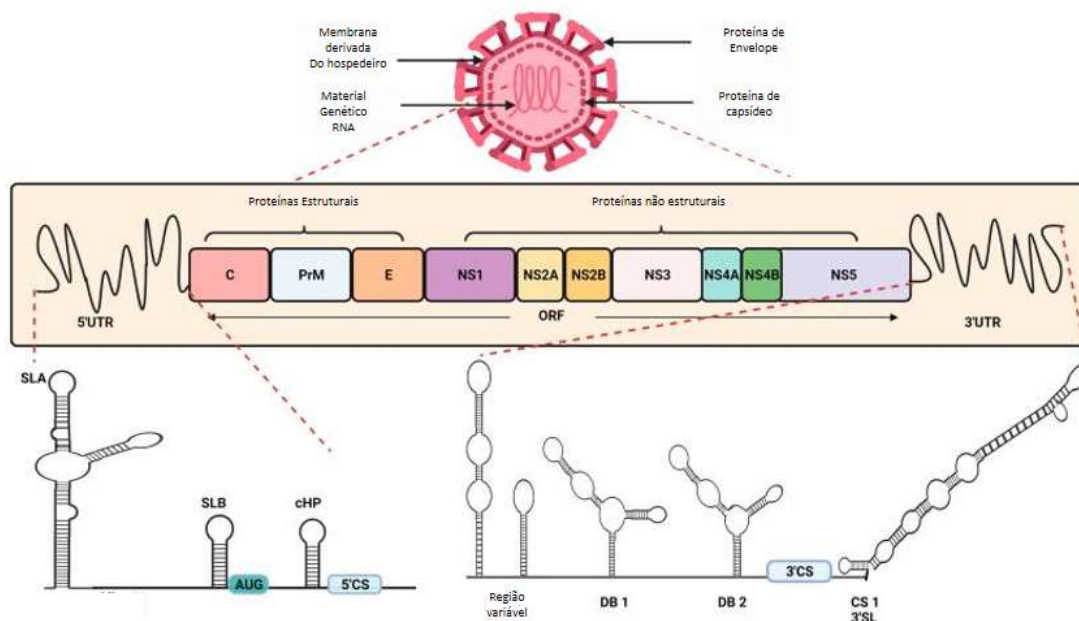


Figura 2 – Organização estrutural do genoma do vírus da dengue: O genoma viral consiste em 5'UTR, uma ORF e 3'UTR. A poliproteína cujo gene é codificado pela ORF serve como modelo para a tradução de 3 proteínas estruturais (C (Capsídeo), PrM (Pré-Membrana) e E (Envelope)) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Fonte: Adaptado de NANAWARE et al., 2021

O vírus da dengue se liga à superfície de uma célula hospedeira por meio da proteína de envelope, reconhecida por receptores celulares, e penetra na célula por um processo denominado endocitose. Ele, então se funde com a membrana endossomal e é liberado no citoplasma. A partícula se desfaz, liberando o genoma viral. O RNA viral é inicialmente traduzido em um único polipeptídeo, que é posteriormente clivado para a síntese de 10 proteínas, e o genoma viral é replicado. A montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE). As partículas virais imaturas são transportadas através da rede trans-Golgi (TGN), onde amadurecem e se convertem em sua forma infecciosa. Os vírus maduros são então liberados da célula e podem infectar outras células (<https://www.nature.com/scitable/content/dengue-virus-replication-22401525/>). A figura 3 representa de forma esquemática o processo de infecção e síntese de novas partículas virais.

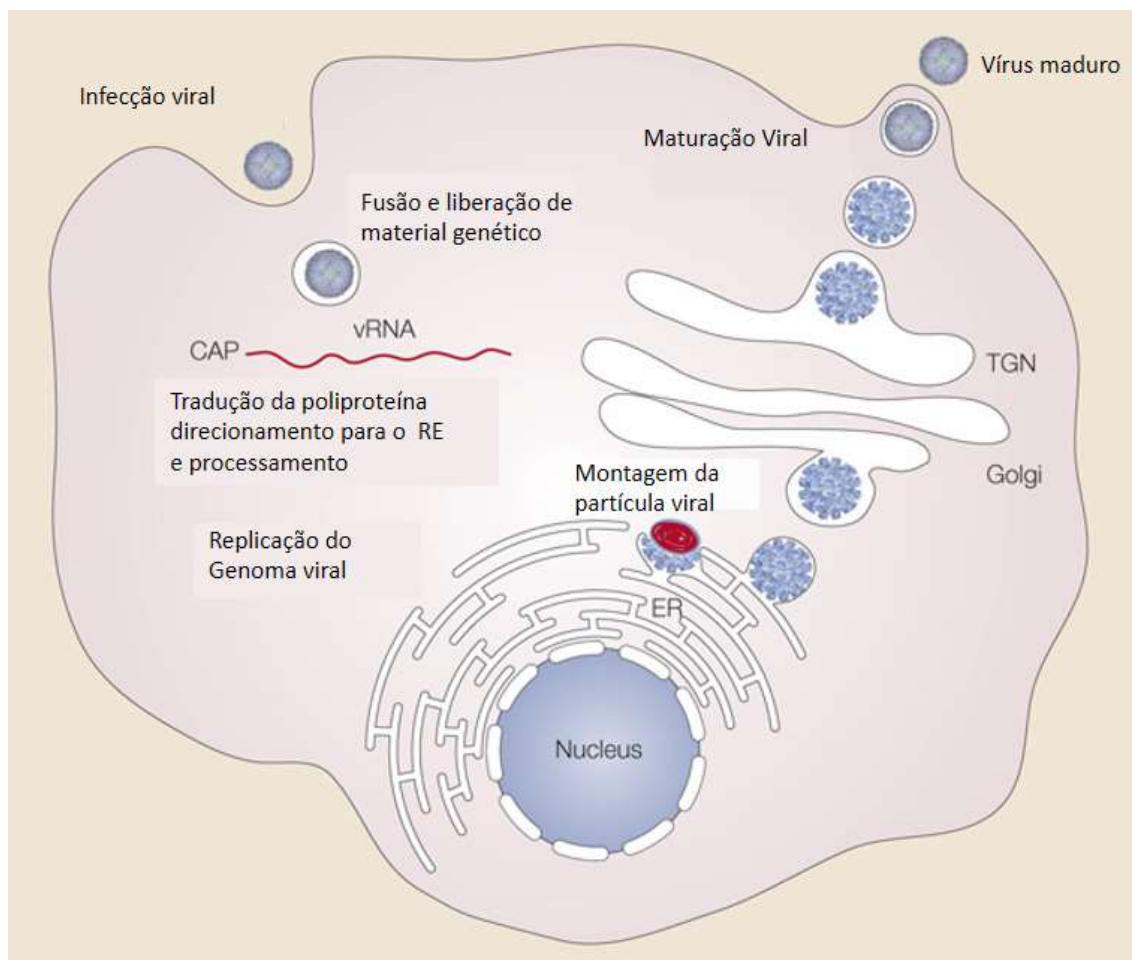


Figura 3 – Replicação do vírus da dengue: O vírus da dengue se liga à superfície de uma célula hospedeira e entra na célula por um processo de endocitose. Uma vez dentro da célula, a partícula viral se funde com a membrana endossômica e o material genético é liberado no citoplasma. O RNA viral é traduzido em um polipeptídeo que é processado e clivado em dez proteínas estruturais e não estruturais. O genoma passa a ser replicado. A montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE). As partículas virais imaturas são transportadas através da rede trans-Golgi (TGN), onde amadurecem e se convertem em sua forma infecciosa. Os vírus maduros são então liberados da célula e podem infectar outras células. Fonte: Adaptado de Scitable by nature education

3.3.4. Resposta imune e Patogenia

Durante o repasto sanguíneo, o mosquito infectado inocula esses vírus na corrente sanguínea do hospedeiro. Eles infectam inicialmente os queratinócitos, tipo de célula mais comum na pele, mas também passam a infectar e se replicar dentro das células de Langerhans, uma célula imunológica dendrítica especializada e localizada na pele (DIAMOND, 2003). As células de Langerhans são células apresentadoras de antígenos, ou seja, detectam

patógenos invasores e, após o processamento, exibem antígenos desses patógenos em sua superfície. Isso ativa a resposta imune inata, ao alertar monócitos e macrófagos, para combater a infecção. Normalmente, monócitos e macrófagos fagocitam e destroem patógenos, mas no caso de dengue, ambas as células são infectadas pelo vírus, assim o vírus da dengue se espalha por todo o corpo. A disseminação e o aumento do vírus resultam em viremia (WU *et al.*, 2000)

Os sintomas provocados pela infecção relacionam-se a níveis séricos elevados de citocinas. São observados, também altos teores séricos de interleucina-2 (IL-2) e de seu receptor solúvel, de CD4 solúvel, interferon- γ (IFN γ), interferon- α (IFN- α) que se mantêm elevado até a convalescença, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de ativação de plaquetas (PAF) (NANAWARE *et al.*, 2021). A leucopenia, relacionam-se aos altos teores de citocinas macrofágicas. As mialgias são conseqüentes, em parte da multiplicação viral no próprio tecido muscular, inclusive músculos oculomotores, sendo responsáveis pela cefaléia retroorbitária frequentemente relatada (FIGUEIREDO, 1999).

O período de viremia pode perdurar por até 10 dias na infecção por DENV. Esse é o período ideal para detecção do vírus por RT-PCR, até 6 dias após o início dos sintomas. A produção do anticorpo IgM se inicia antes do final da viremia, cerca de 4 dias após o início dos sintomas, atingindo picos entre 6 e 14 dias, e decaindo gradualmente, até se tornar indetectável por volta de 50 dias após o início dos sintomas. Os anticorpos do tipo IgG passam a ser detectáveis 6 dias após o início da sintomatologia. A permeância de anticorpos do tipo IgG pode se estender por anos, protegendo contra possíveis infecções com o mesmo sorotipo (GUZMAN *et al.*, 2010). O gráfico 3 demonstra a viremia e o aumento de anticorpos do tipo IgM e IgG contra o vírus da dengue em função dos dias.

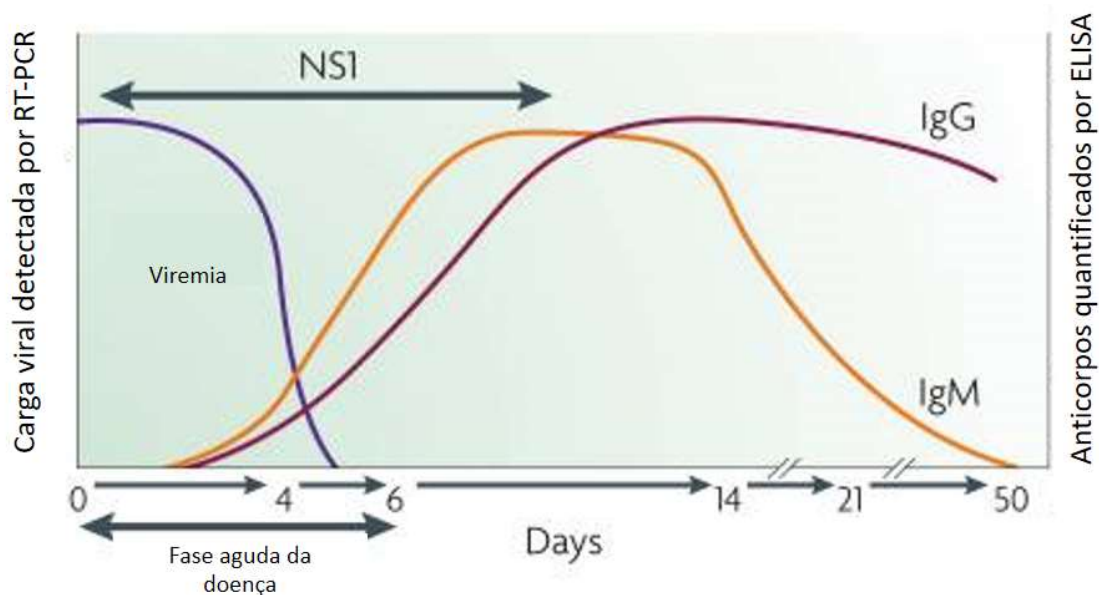


Gráfico 3 – Resposta humoral ao vírus da dengue: Viremia e aumento de anticorpos do tipo IgM e IgG contra o vírus da dengue em função dos dias pós início dos sintomas. Fonte: Adaptado de GUZMAN et al. 2010.

3.3.5 Proteína de Envelope e 80% de E

A estrutura tridimensional da proteína E consiste de um complexo dimérico com duas subunidades idênticas. Os dímeros da proteína E, quando expostos a pH ácido ($\text{pH} < 6,5$), sofrem uma transformação conformacional, sendo rearranjados em trímeros. Após a ligação viral ao receptor de membrana e a entrada da partícula no citoplasma por pinocitose, a conformação em trímeros da proteína E é descrita como fundamental para o processo de fusão do envelope viral com a membrana endossômica (MODIS *et al.*, 2004; COLLIER *et al.*, 2011)

Os epítomos da proteína E são os alvos primários para a produção de anticorpos neutralizantes. Esses anticorpos são dirigidos a epítomos existentes em toda a superfície externa da molécula e direcionam a produção de anticorpos específicos para cada sorotipo. O mecanismo de neutralização relaciona-se à dissociação do dímero de E pela presença do anticorpo, impedindo as alterações conformacionais que levam à formação dos trímeros da molécula. A neutralização também pode ocorrer obstruindo o sítio de ligação viral ao receptor de membrana celular (PITCHER *et al.*, 2015).

O protagonismo dessa proteína durante o processo de infecção e preparo para replicação do vírus faz dela um importante alvo para o desenvolvimento de vacinas e também para aplicação em testes diagnósticos (COLLER *et al.*, 2011; CUZZUBBO *et al.*, 2001).

3.4 Diagnóstico de DENV

O diagnóstico laboratorial precoce e preciso é essencial para o manejo adequado dos pacientes infectados pelo vírus da Dengue. A detecção do material genético do vírus, da conversão sorológica e a captura da proteína NS1 têm sido os principais métodos utilizados no diagnóstico (MULLER, DEPELSENAIRE & YOUNG, 2017).

A detecção do material genérico viral é realizada por RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase, do inglês “*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*”) ou qRT-PCR (Reação em cadeia da polimerase *em tempo real*, do inglês “*Real Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*”) para amplificação do RNA viral presente em amostras de soro ou plasma de indivíduos com suspeita de infecção (DEUBEL *et al.*, 1990). Esses testes devem ser realizados até o sexto dia após o início dos sintomas, durante o período virêmico e são considerados o padrão-ouro para diagnóstico da doença. Todavia, são teste mais caros, que demandam uma maior estrutura laboratorial e conhecimento técnico para a execução, não sendo a primeira opção de escolha dentro do SUS e tornando-se inviáveis em áreas com menor disponibilidade de recursos (SIMO, BURT & MAKOAHA, 2023).

Métodos alternativos como a detecção de anticorpos humanos e de antígenos virais também podem ser utilizados em testes sorológicos, como ELISAs e testes rápidos imunocromatográficos, que demandam insumos específicos, normalmente produzidos de forma recombinante (SIMO, BURT & MAKOAHA, 2023).

Para Ensaios de ELISA indireto, são utilizadas proteínas recombinantes, capazes de interagir com anticorpos IgM e IgG específicos presentes no soro humano. A Proteína de Envelope do vírus da Dengue é comumente utilizada nesses testes, devido a sua associação com a produção de anticorpos neutralizante (PITCHER *et al.*, 2015). Em geral, esses testes são incapazes de

promover diferenciação entre os sorotipos (MULLER, DEPELSENAIRE & YOUNG, 2017).

Os testes rápidos normalmente consistem em imunocromatografia de fluxo lateral (IFL) e são uma importante ferramenta para o diagnóstico em regiões com menos recursos (MAGALHAES, BRAGA & FOY, 2020). No Brasil, são testes amplamente utilizados para fechamento de diagnóstico clínico no SUS, devido a facilidade de execução, de acordo com o guia de vigilância em saúde (disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/guia-vigilancia-saude-5ed-rev-atual.pdf>).

Muitos testes utilizam insumos recombinantes, como proteínas ou anticorpos monoclonais, estes especialmente contra a proteína NS1 (proteína não estrutural 1). Essa proteína é um alvo diagnóstico ideal porque é secretada por células infectadas e encontrada circulante no sangue de indivíduos infectados desde o início dos sintomas. A NS1 pode ser detectada ao mesmo tempo que o material genético viral e antes da resposta de anticorpos em infecções primárias, por isso é utilizada como um marcador substituto para viremia, detectável até 9 dias após o início da sintomatologia. (MULLER, DEPELSENAIRE & YOUNG, 2017).

O diagnóstico sorológico de Dengue deve ser realizado entre 6 dias e 2 meses após o início da apresentação dos sintomas para IgM e 8 dias após o início dos sintomas para IgG. Anticorpos do tipo IgG tendem a ser mais duradouros, e podem permanecer no soro por anos (GUZMAN *et al.*, 2010).

3.5 CHIKV

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus transmitido por mosquitos, que ressurgiu recentemente em diversas partes do mundo, causando surtos em grande escala, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. É um vírus pertencente à família *Togaviridae*, composta unicamente pelo gênero *Alphavirus* e apresenta um genoma de RNA fita simples sentido positivo (ssRNA+) (COSTA *et al.*, 2023).

3.5.1 Epidemiologia

O vírus Chikungunya (CHIKV) foi isolado pela primeira vez no soro de um paciente infectado durante um grande surto de uma doença artrítica debilitante em 1952 na Tanzânia (ROSS et al., 1956). O nome “*chikungunya*” é um termo da língua kimakonde para descrever a doença e pode ser traduzido como “doença que dobra as articulações”, devido à postura curvada e ao andar rígido dos indivíduos infectados. Durante aproximadamente 50 anos após o seu isolamento inicial, o CHIKV causou apenas surtos ocasionais na África e na Ásia (ROBINSON, 1955; DE LIMA CAVALCANTI et al., 2021).

A doença aguda do CHIKV assemelha-se sintomaticamente à dengue, e relatos de casos retrospectivos sugerem que surtos de CHIKV ocorreram já em 1779, mas foram atribuídos incorretamente ao vírus da dengue. No entanto, ao contrário da dengue, uma característica da doença provocada pelo CHIKV é o acometimento músculo-esquelético recorrente, que afeta principalmente as articulações periféricas e que pode persistir durante meses a anos após a infecção aguda (CAREY, 1971).

A grande maioria dos indivíduos infectados pelo CHIKV desenvolve a febre chikungunya, uma doença aguda caracterizada por início rápido de febre, poliartralgia incapacitante e artrite, erupção cutânea, mialgia e dor de cabeça. (THIBERVILLE et al., 2013). Embora as taxas de mortalidade por CHIKV sejam baixas, e a doença seja frequentemente autolimitada, este vírus impõe uma morbidade pronunciada, resultando num impacto substancial na qualidade de vida dos indivíduos infectados e em perdas econômicas significativas, especialmente nos países em desenvolvimento (SILVA & DERMODY, 2017).

Estudos recentes sugerem que o impacto da doença chikungunya é excepcionalmente elevado, levando ao afastamento de atividades laborais e significativos custos a economias locais. Isso ocorre devido ao seu grande potencial epidêmico e às dores articulares associadas, que podem ser graves e incapacitantes (CARDONA-OSPINA, DIAZ QUIJANO & RODRIGUEZ-MORALES, 2014).

O CHIKV também representa uma grave ameaça à saúde pública em áreas não endêmicas onde estão estabelecidos vectores competentes *do*

Aedes. A circulação silvestre desse arbovírus pode ser responsável pela manutenção do vírus em regiões que dispõe de vetores e hospedeiros susceptíveis (COSTA *et al.*, 2023).

No Brasil, anualmente, os picos de incidência concentram-se no período chuvoso, devido a melhor propagação do vetor (SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021). No ano de 2023, até a semana epidemiológica 48, foram registrados 149.901 casos da doença e 100 óbitos provocados por desdobramentos dela, de acordo com o boletim do ministério da saúde.

3.5.2 Partícula viral e ciclo replicativo

O vírus Chikungunya é um vírus esférico e envelopado com aproximadamente 70 nm de diâmetro (SILVA & DERMODY, 2017). Seu genoma consiste em um RNA fita simples de sentido positivo com 12 kb. Os dois quadros de leitura abertos (ORFs) presentes no genoma estão separados por uma junção não codificadora e duas regiões não traduzidas denominadas 5'UTR e 3'UTR. O 5'ORF codifica uma poliproteína não estrutural (P1234) que será posteriormente clivada em proteínas não estruturais nsP1 a 4. O 3'ORF codifica as proteínas estruturais: capsídeo (C), envelope 3 (E3), envelope 2 (E2), 6K e envelope 1 (E1) (STRAUSS E STRAUSS, 1994; SOLIGNAT *et al.*, 2009 ; CONSTANT *et al.* 2021).

A transmissão do CHIKV ocorre majoritariamente através da picada de mosquitos *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* infectados. Após a infecção, o CHIKV se replica inicialmente na pele, nos fibroblastos, e se dissemina para o fígado, músculos, articulações, tecido linfóide (gânglios linfáticos e baço) e cérebro através do sangue durante o período de viremia. É, também nesse período, que novos mosquitos são infectados durante o repasto sanguíneo. (CONSTANT *et al.* 2021; REIS *et al.*,2021).

No processo de transdução e replicação, a proteína E2 do vírus se liga à superfície das células alvo por meio de receptores celulares e o CHIKV entra na célula por endocitose. A fusão do envelope viral e da membrana

endossômica libera o nucleocapsídeo no citosol. Esse nucleocapsídeo é desmontado e libera RNA genômico de sentido positivo. Ocorre, então a tradução da poliproteína não estrutural (nsP). Quatro nsPs, juntamente com RNA genômico montam-se na membrana plasmática e modificam-na para formar compartimentos de replicação viral (esférulas) contendo RNA viral dupla fita. nsP1–4 funciona como uma replicase para gerar RNAs genômicos, antígenômicos e subgenômicos. A internalização das esférulas permite a formação de grandes vacúolos citopáticos (CPV-I do inglês “*cytoplasmatic vacuoles*”), que abrigam múltiplas esférulas. As esférulas na membrana plasmática ou no CPV-I estão totalmente funcionais. A tradução do RNA subgenômico produz a poliproteína estrutural. As poliproteínas E3-E2-6K-E1/E2-E2-TK são translocadas para o retículo endoplasmático. E2/E1 são modificados pós-tradução, transitam pelo sistema secretor e são depositados na membrana plasmática. A interação do capsídeo e do RNA genômico leva à formação de nucleocapsídeos icosaédricos, estes se reúnem com E2/E1 na membrana e resultando no brotamento de vírions de progênie madura. Tardamente na infecção, formam-se CPV-IIs, contendo redes hexagonais de E2/E1 e repletos de nucleocapsídeos. Os CPV-II provavelmente servem como veículos de transporte e locais de montagem para proteínas estruturais, permitindo a formação de vírions maduros e de saída. (SILVA & DERMODY, 2017; REIS *et al.*, 2021; CONSTANT *et al.* 2021;). A representação esquemática desse processo está demonstrada na figura 4.

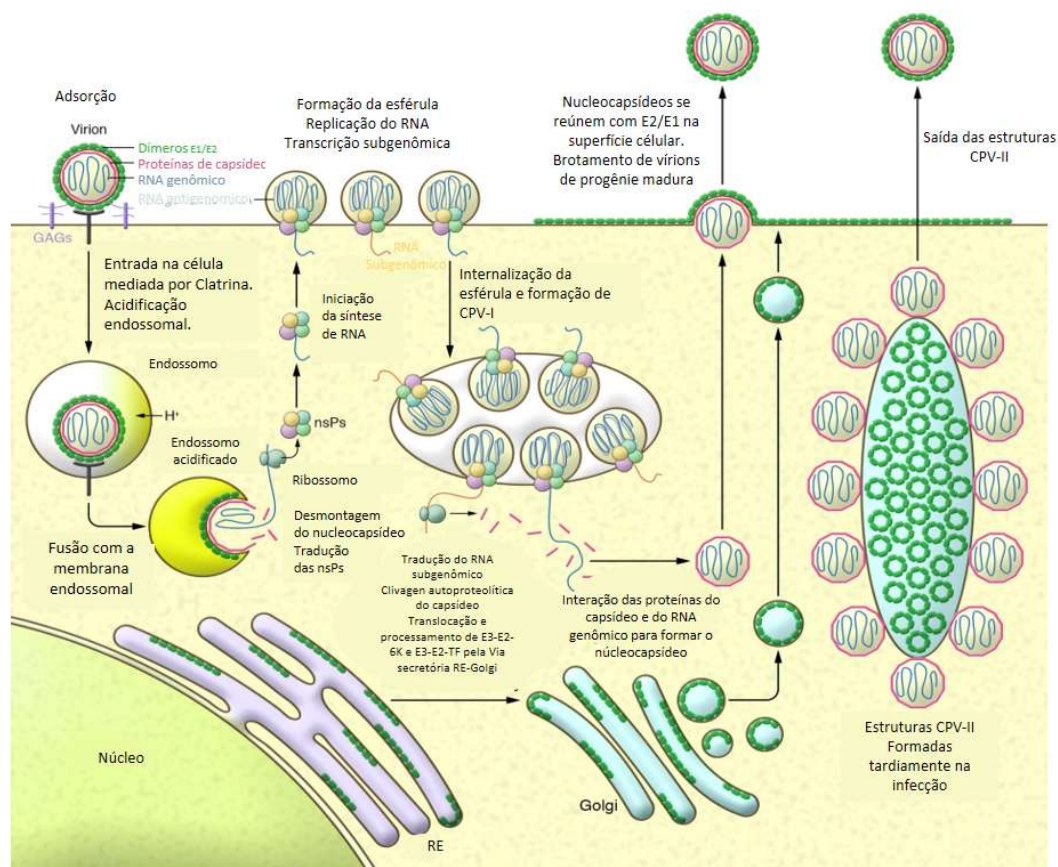


Figura 4 – Ciclo de replicação do CHIKV em células de mamífero. Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus Chikungunya em células de mamíferos. Fonte: Adaptado de SILVA & DERMODY, 2017.

3.5.3. Resposta imune e patogênese

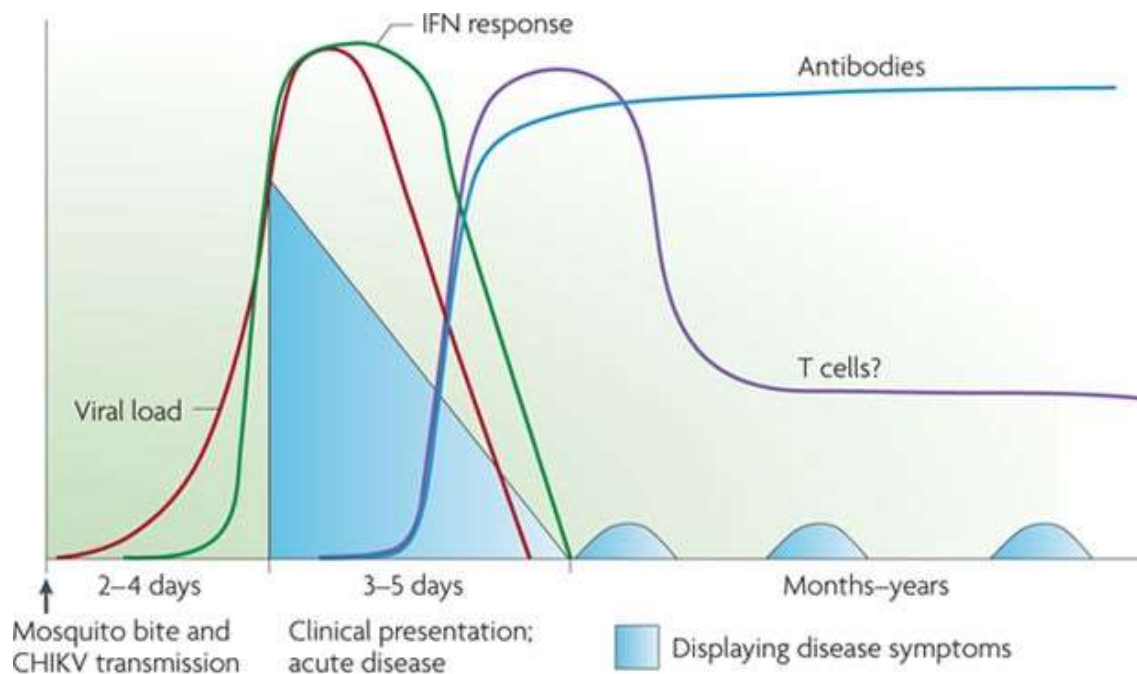
O período de incubação do vírus é de 2 a 4 dias e é seguido por um início súbito da doença. Infecções assintomáticas podem ocorrer, mas são raras, sendo observadas em cerca de 15% dos indivíduos infectados (CONSTANT *et al.* 2021).

A febre Chikungunya é um espectro de doença caracterizado por febre alta, persistente e autolimitada, cefaleia, mialgia e poliartralgia moderada a grave, com fortes dores nas articulações que são muitas vezes incapacitantes (CUNHA & TRINTA, 2017). Os exames sorológicos de pacientes com CHIKV costumam indicar linfopenia e/ou trombocitopenia moderada e níveis elevados de alanina transaminase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina e creatinina quinase, o que demonstra o comprometimento do fígado e dos rins durante a infecção (SUHEBIER, 2019; CONSTANT *et al.* 2021). Os sintomas

geralmente desaparecem entre a primeira e a segunda semana pós-infecção, ocorrendo juntamente com a restauração dos parâmetros sorológicos. No entanto, 30-40% dos casos evoluem para uma fase crônica, na qual a artralgia debilitante persiste durante meses ou mesmo anos (BORGHERINI *et al.*, 2008; MARIMOUTOU *et al.*, 2015)

Embora o CHIKV seja um vírus marcadamente artritogênico, ele também pode infectar o sistema nervoso. Entre as complicações neurológicas, os sintomas mais prevalentes parecem ser estado mental anormal, cefaleia, déficits focais e convulsões (BORGHERINI *et al.*, 2008; SILVA & DERMODY, 2017)

O início da doença coincide com o aumento da viremia, que desencadeia a ativação de uma resposta imune inata, comumente associada à produção de interferons tipo I (IFNs), como se vê no gráfico 4. A maioria dos pacientes elimina o vírus com sucesso aproximadamente 1 semana após a infecção, e somente neste momento há evidências de imunidade adaptativa específica do CHIKV (respostas mediadas por células T e anticorpos) (SCHUWARTZ *et al.*, 2017).



Nature Reviews | Microbiology

Gráfico 4 – Resposta imune ao vírus Chikungunya. Fonte: Adaptado de SCHWARTZ *et al.*, 2010

3.5.4 Proteína E₂

Como já descrito anteriormente, e reproduzindo padrões de outros alfavírus, o CHIKV entra nas células por endocitose mediada por receptor e por uma subsequente etapa de fusão dependente do pH (KUMAR, SUDEEP & ARANKALLE, 2012). O Vírus possui, para isso, duas proteínas de superfície que medeiam a entrada celular: as glicoproteínas transmembrana E₂ e E₁ (WEBER et al., 2017)

A proteína E₂ medeia a ligação à superfície celular e a proteína E₁ é uma proteína de fusão viral de classe II, envolvida na fusão do envelope viral com a membrana endossômica, dependente de pH (SILVA & DERMODY, 2017). E₂ e E₁ associam-se como trímeros de heterodímeros na superfície da partícula (VOSS et al., 2010).

A proteína do envelope E₂ consiste no domínio C, localizado próximo à membrana viral, domínio A, no centro da proteína, e domínio B, na extremidade distal, proeminentemente exposto na superfície viral. Esses domínios são locais promissores de interação com a célula alvo (VOSS et al., 2010; WEBER et al., 2017). Os prováveis parceiros desse vírus interação na superfície celular são os glicosaminoglicanos (GAGs). Eles estão onipresentes nas superfícies de todas as células animais e são uma parte essencial da matriz extracelular (MEC) (KAMHI et al., 2013). Os GAGs que estão covalentemente ligados a uma proteína central são chamados de proteoglicanos (PGs).

Por estarem presentes na superfície da membrana extracelular de todas as células, os GAGs são alvo de muitos patógenos para atravessar a barreira da membrana celular. Eles são utilizados para ligação inicial às células ou como receptores de entrada. Esses patógenos incluem várias bactérias, parasitas e vírus, como o da Hepatite C e da Dengue (LIU & SUZANNE, 2002). Este é um dos mecanismos sugerido para a ligação da proteína E₂, entretanto, o papel dos GAGs na replicação do CHIKV ainda não foi amplamente estudado (WEBER et al., 2017)

A proteína E₂ é, portanto, desempenha um papel importante na patogenicidade do vírus e manutenção do ciclo replicativo, pois esta envolvida na fusão do vírus à célula hospedeira (SILVA & DERMODY, 2017; WEBER et

al., 2017; SIMO, BURT & MANOAH, 2023). Além disso, por apresentar domínios expostos na superfície do envelope viral, que já foram associados à produção de anticorpos neutralizantes (GOH et al., 2013), ela tem sido um importante instrumento aplicado ao diagnóstico e como potencial alvo vacinal (KUMAR, SUDEEP & ARANKALLE, 2012; SIMO, BURT & MANOAH, 2023)

3.6 Diagnóstico de CHIKV

O diagnóstico laboratorial preciso é indispensável para reduzir a morbidade associada a infecção pelo CHIKV. Semelhantemente ao que ocorre para outros arbovírus a amplificação do material genético viral presente em amostras de soro ou plasma de indivíduos com suspeita de infecção é realizada por RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase, do inglês “*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*”) ou qRT-PCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês “*Real Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*”) (SIMO, BURT & MAKOA, 2023). Esses são os testes considerados padrão ouro para o diagnóstico da doença e devem ser realizados durante o período virêmico, entre o primeiro ao oitavo dia de sintomas, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Todavia demandam infraestrutura complexa e mão de obra especializada, especialmente em se tratando de CHIKV, um patógeno nível 3 de biossegurança (WU et al., 2000).

No Brasil, o diagnóstico é clínico no Sistema único de Saúde (SUS) e confirmado, majoritariamente por testes laboratoriais sorológicos ou moleculares (mais raramente), de acordo com o guia de vigilância em saúde (disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/guia-vigilancia-saude-5ed-rev-atual.pdf>).

Os testes sorológicos incluem ELISA indireto, que usualmente utilizam para a sensibilização de placas as proteínas E₁ e E₂ produzidas de forma recombinante e capazes de interagir com anticorpos do tipo IgM e IgG presente no soro de indivíduos infectados (SIMO, BURT & MAKOA, 2023). Os testes rápidos normalmente consistem em imunocromatografia de fluxo lateral (IFL) e podem associar os antígenos proteicos a anticorpos monoclonais para detecção de anticorpos IgM e IgG. (MAGALHAES, BRAGA & FOY, 2020).

Para detecção de IgM, que indica o contato recente com os vírus, o diagnóstico deve ser realizado entre 5 dias e 2 meses após o início da apresentação dos sintomas (SIMO, BURT & MAKOA, 2023). A detecção de anticorpos IgG pode ser realizada a partir de 10 dias após o início dos sintomas. Esses anticorpos tendem a ser mais duradouros, permanecendo no soro por longos períodos (WU *et al.*, 2000).

Os testes de imunocromatografia de fluxo lateral têm como limitação o menor desempenho em sensibilidade para a detecção de anticorpos quando comparados ao ELISA. A realização dos testes sorológicos dentro dos períodos preconizados para um melhor desempenho também é um fator limitante para sua utilização (DA SILVA NETO, TABOSA DE OLIVEIRA & TEIXEIRA, 2022).

3.7 Sistemas de expressão de proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes são insumos fundamentais para uma grande variedade de produtos, como testes de diagnóstico, vacinas e medicamentos produzidos pela indústria farmacêutica. Elas são proteínas codificadas por sequências de DNA, e produzidas por um organismo heterólogo (Wurm, F, 2004; SCHMIDT, 2004).

A primeira proteína recombinante utilizada em tratamento foi a insulina humana recombinante em 1982. Nos últimos 30 anos, houve grandes avanços nas tecnologias de expressão. Atualmente há uma maior variedade de plataformas disponíveis, maior capacidade produtiva e diminuição do tempo de produção. (BRONDYK, 2009; PHAM, 2018).

Essas proteínas podem ser utilizadas para diversas aplicações: são insumos imunobiológicos para pesquisa e diagnóstico, em experimentos de Western Blot ou ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimático) (SCHMIDT, 2004). Também têm sido amplamente utilizadas como plataforma para a produção de vacinas, como a SpiN-TEC: Vacina contra a COVID-19 desenvolvida com tecnologia 100% nacional por pesquisadores do grupo (CASTRO *et al.*, 2022).

Diversos sistemas de expressão estão atualmente disponíveis, algumas características associadas a eles estão apresentadas na tabela 1.

<i>Tipo de Célula</i>	<i>Células de mamífero</i>	<i>Células de inseto + Baculovirus</i>	<i>Leveduras</i>	<i>Bactérias</i>
<i>Produção em Larga escala</i>	Possível inclusive para proteínas complexas	Possível inclusive para proteínas complexas	Possível para algumas proteínas	Possível para algumas proteínas
<i>Modificações pós traducionais</i>	Presentes	Presentes	Podem ser altamente imunogênicas	Ausentes
<i>Custo de produção</i>	Elevado	Moderado	Moderado	Baixo
<i>Necessidade de protocolos complexos para a expressão</i>	+	+	+	-
<i>Padrão de crescimento</i>	Variável	Intermediário	Rápido	Rápido

Tabela 1 – Características associadas a produção de proteínas recombinantes em diversas plataformas. Fontes: BRONDYK, 2009; COLLIER et al. 2011; ROSANO & CECCARELLI, 2014; REIS et al., 2021; CASTRO et al., 2022.

3.7.1 Sistemas de expressão em organismos procariotes

A expressão de proteínas recombinantes em organismos procariontes foi a primeira a ser realizada e é bem estabelecida na literatura. Por esta razão, existem muitas ferramentas e protocolos moleculares disponíveis para a produção de altos níveis de proteínas heterólogas (SOARES et al., 2003; SORONSEN & MORTENSEN, 2005).

A expressão proteica em bactérias é mais simples, altamente escalonável, rápida e apresenta baixos custos associados ao processo

(BANEYX, 1999). De forma simplificada, o gene de interesse é clonado em um vetor plasmidial de expressão, em seguida, o organismo hospedeiro selecionado para a expressão é transformado com esse vetor. A expressão gênica é induzida e a proteína recombinante produzida pode ser preparada para os processos de purificação e caracterização (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

A utilização de bactérias para a expressão de proteínas oferece um método rápido e simples, devido ao seu curto tempo de duplicação. A avaliação da expressão genética recombinante em *E. coli* pode demorar menos de uma semana (ZERBS, FRANK & COLLART, 2009). Além disso, a modificação gênica é relativamente simples e os meios de crescimento para *E. coli* são baratos (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

Apesar das vantagens, quando aplicada à expressão de proteínas originárias de organismos eucariontes, as proteínas expressas em células procariontes apresentam variações na estrutura final. Isso ocorre porque as bactérias, em geral, são incapazes de proceder modificações pós traducionais (BRONDYK, 2009). A ausência dessas modificações pós traducionais pode interferir na funcionalidade das proteínas, especialmente quando aplicadas ao diagnóstico e como antígenos vacinais. O dobramento correto das proteínas e suas estruturas terciárias podem ser indispensáveis para as interações antígeno-anticorpo (ZERBS, FRANK & COLLART, 2009; COLLIER *et al.*, 2011)

3.7.2 Sistemas de expressão em organismos eucariontes

Para as proteínas que requerem modificações pós-traducionais, como glicosilação, é necessário proceder a expressão em plataformas eucariontes. Células de inseto/baculovírus, células de mamíferos, como HEK (Células Embrionárias de rim humano) e CHO (Células de Ovário de Hamster Chinês), e leveduras são alguns dos sistemas capazes de realizar tais modificações (SCHMIDT, 2004)

As MPTs (modificações pós traducionais) incluem o dobramento proteico por chaperonas, glicosilações e formação de pontes de sulfato (SAHDEY, KHATTAR & SAINI, 2008). Em alguns casos, essas modificações podem interferir em diversos fatores associados à proteína, como antigenicidade, e

atividade. Por isso, a expressão de proteínas em células que reproduzem padrões nativos de modificações pós traducionais pode ser indispensável em alguns casos (ASSENBERG *et al.*, 2013)

Ao longo da última década, protocolos de transfecção eficientes, sejam eles transitórios ou permanentes, e uma diversidade de células eucariontes geneticamente modificadas para otimização da expressão foram desenvolvidos. (SAHDEY, KHATTAR & SAINI, 2008)

Praticamente todas as plataformas eucariontes de expressão são capazes de promover as MPTs. Entretanto a escolha da célula ideal, exige uma análise de fatores como o tamanho da proteína, solubilidade, organismo de origem e formação de estruturas quaternárias (WURM & BERNARD, 1999; COLLIER *et al.*, 2011). Essas e outras características da proteína que se pretende expressar precisam ser analisadas em contraponto com as características das células hospedeiras disponíveis, que tem padrões próprios para realizar essas modificações. Com isso, é possível definir as ferramentas moleculares necessárias e os possíveis equipamentos ou reagentes, como meios de cultivo (GRAY, 1997; ALVIM *et al.*, 2022).

Para a expressão de proteínas de origem viral, especialmente vírus que infectam humanos, como DENV e CHIKV, a utilização de células de mamífero é desejada. O padrão de modificações que se deseja reproduzir deve ser muito semelhante ao observado nas proteínas virais durante a infecção (COLLER *et al.*, 2011). Proteínas virais expressas em bactérias podem induzir respostas imunes inesperadas após a imunização e tendem a apresentar piores interações, especialmente com anticorpos do tipo IgM. (Keyt *et al.* 2020)

3.8 Expressão transiente x Expressão estável

Além da escolha da plataforma com a qual se pretende trabalhar, em se tratando de células eucariontes, duas abordagens de expressão podem ser selecionadas: Expressar as proteínas recombinantes de forma transiente ou estável (CONDREAY *et al.*, 1999)

A abordagem de transfecção transitória para a síntese do bioproduto é mais prática, demandando transfecção com veículos apropriados para a célula utilizada, seguida da expressão e obtenção da proteína de interesse. Essa

estratégia, entretanto, tem sido limitada principalmente à escala laboratorial devido à baixa produtividade média no tempo e os altos custos do processo produtivo (WURM & BERNARD, 1999; CHEEKS *et al.*, 2009; ASSENBERG *et al.*, 2013).

Embora sejam encontrados diversos protocolos para a transfecção transitória em escala, estes geralmente envolvem culturas de células aderidas e cultivadas em monocamada. Novas tecnologias para a transfecção de células em suspensão têm sido desenvolvidas, mas podem apresentar altos custos associados à produção (WURM & BERNARD, 1999; <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-expression-handbook/pex-handbook-mammalian-cell-based-protein-expression.html>). Com isso, a maioria dos métodos não é adequada para fabricação em larga escala devido ao custo dos materiais e equipamentos, juntamente com os requisitos de espaço e os grandes volumes cultivo necessários (GEISSE & FUX, 2009).

No entanto, a transfecção transitória pode ser uma abordagem mais prática para a fabricação de alguns produtos biológicos recombinantes, que podem ser tóxicos ou prejudiciais para a célula hospedeira, como é o caso dos vetores virais (TOMÁS *et al.* 2018).

Linhagens celulares transfectadas de forma estável podem permitir elevados rendimentos através da expressão contínua do produto, elas também permitem otimizações, como clonagem e seleção de clones de alta expressão (HACKER & BALASUBRAMANIAN, 2016). O processo de seleção de células com expressão estável pode ser penoso e exigir habilidade no manejo das culturas, uma vez que estas perdem muita viabilidade nos primeiros dias após adição de antibióticos de seleção. A seleção de clones que expressem de forma estável tais produtos, também provou ser malsucedida em muitos casos (CHEEKS *et al.*, 2009). Entretanto a reprodutibilidade do processo e os menores custos associados à expressão podem compensar o esforço para estabilização dessa expressão. Proteínas aplicadas ao diagnóstico ou utilizadas para imunização, por exemplo, precisam manter altos padrões de reprodutibilidade e ser economicamente viáveis (ALVIM *et al.*, 2022).

3.8.1 Vetor plasmidial aplicado à expressão estável

A expressão estável requer a transferência de um DNA exógeno para a célula da plataforma escolhida. Vetores plasmidiais são comumente utilizados para essa transferência por meio de transfecção e precisam conter sinais relevantes para a tradução do gene de interesse pela RNA polimerase em células eucariontes (GRAY, 1997). Dentre as sequências necessárias para um bom funcionamento do vetor estão: sítio múltiplo de clonagem promotor-distal, origem de replicação para *E. coli*; sequência de poliadenilação (que pode originar de SV40 ou hormônio de crescimento bovino); origem de replicação eucariótica (por exemplo, SV40 ou oriP); gene para expressão da proteína de interesse clonado próximo ao promotor e um promotor (GEISSE & FUX, 2009).

Os marcadores de seleção também são sequências extremamente importantes. Para a transformação em *E. coli*, permitem selecionar as colônias transformadas. Já os marcadores de seleção para células de mamífero podem ser utilizados para selecionar aquelas células corretamente transfectadas (WURM & BERNARD, 1999). Trabalhos mais recentes sugerem a possibilidade de indução de uma expressão estável de proteínas após a seleção de culturas previamente transfectadas e submetidas a sucessivas passagens, os mecanismos por trás dessa expressão, porém, não estão bem elucidados (BARNES, BENTLEY & DICKSON, 2001; ALVIM *et al.*, 2022).

3.8.2 Vetor viral (Lentivírus)

Os vetores lentivirais são excelentes ferramentas para transferência de genes, devido à sua capacidade de integração permanente no genoma celular, sustentando a expressão estável a longo prazo (TOMÁS *et al.* 2018)

A plataforma consiste na utilização de uma partícula lentiviral não replicativa, comumente obtida a partir do HIV-1, utilizada para transduzir as células alvo e promover a integração de um transgene (SANBER *et al.*, 2015). O sistema lentiviral de 3ª geração utiliza três plasmídeos diferentes para gerar linhagens celulares de expressão estável. O primeiro plasmídeo contém o gene de interesse, geralmente flanqueado por sequências LTR (do inglês “*Long Terminal Repeat*” – repetição terminal longa), que são integradas ao genoma do hospedeiro. O segundo plasmídeo codifica os componentes necessários para o

empacotamento do lentivírus, como Gag, Pol, Tat e Rev. O terceiro e último plasmídeo é o que codifica a proteína do envelope viral responsável pela interação com receptores e adsorção da partícula (TANDON *et al.*, 2018)

Apesar das grandes vantagens associadas ao sistema, algumas desvantagens são a toxicidade dos vetores para as células em que são montados, a aleatoriedade da integração gênica e a impossibilidade de quantificação do número de partículas obtidas após uma co-transfecção (SANBER *et al.*, 2015).

]

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Construção dos genes

4.1.1 Sequências consenso para os genes de interesse

As sequências gênicas utilizadas para DENV 1, 2 e 4 foram previamente desenhadas por Oliveira, 2019. Elas correspondem às sequências dos sorotipos que circularam na América do Sul entre os anos de 2005 e 2014 adquiridas do banco de dados do National Center for Biotechnology Information - NCBI (GenBank). Elas foram alinhadas para obtenção de sequências consenso e a porção transmembrana foi removida originando uma nova sequência, que corresponde a aproximadamente 80% da proteína original.

Para o sorotipo 3 de DENV, a sequência gênica da proteína de envelope foi previamente desenhada por Quinan, 2014 e obtida por meio da extração de uma amostra viral de DENV-3 genótipo III Pi-80 4P circulante no país. Também foi realizada a remoção da porção transmembrana. Para CHIKV, a sequência gênica da proteína E2 foi construída por Bagno, 2017, baseada em amostras brasileiras e do genótipo asiático depositadas no *GenBank*, também com remoção da porção transmembrana.

4.1.2 Genes para expressão em células de mamífero

Para a expressão de proteínas em células de mamífero, algumas sequências nucleotídicas específicas foram adicionadas ao cassete de expressão. Na região N-terminal da sequência consenso dos genes, foram incluídas a sequência Kozak, que favorece o reconhecimento de AUG em eucariotos e facilita a interação ribossomal do mRNA (Acevedo. *et al*, 2018) , e o peptídeo sinal do gene do tPA (ativador de plasminogênio tecidual humano) para secreção proteica (Wang *et al*, 2011). A sequência codificadora da cauda de histidina (6x HIS) foi acrescentada na região C-terminal, para permitir a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, e ao final da construção, foi incorporado um códon de terminação.

Para posteriores subclonagens, sítios de clivagem para enzimas de restrição foram introduzidos, flanqueando o gene construído para liberação do inserto.

Os genes foram sintetizados pela *GenScript* e clonados no vetor pcDNA 3.1 (+) no sítio múltiplo de clonagem entre os sítios de restrição das enzimas NheI e ApaI. Esse plasmídeo é capaz de induzir expressão transiente e estável em células de mamífero, por conter o promotor CMV a montante do sítio múltiplo de clonagem.

4.2 Clonagem e confirmação de identidade dos plasmídeos

4.2.1 Transformação

Para proceder a transformação bacteriana, 100 µL de XL1-blue quimiocompetente foram descongelados no gelo e incubados por 10min com 40 ng de DNA plasmidial ainda no gelo. Para transformações com produto de ligação, todo volume final da ligação foi adicionado às bactérias descongeladas. Posteriormente submeteu-se essas bactérias a choque térmico a 42 °C por 55s seguidos de 2 min em banho de gelo. Adicionou-se 400 µL de meio LB* e a recuperação foi de 1h em shaker a 37°C e 200RPM. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB ágar* seletivo com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas overnight a 37°C em estufa.

Das colônias obtidas após o crescimento, foram selecionados dois clones crescidos e espacialmente separados na placa de Petri para inóculo no volume de 10 ml de meio LB* suplementado com ampicilina 100 µg/mL. Os inóculos foram incubados overnight a 37°C em incubadora com agitação orbital (ThermoFisher) sob rotação de 200 RPM. Após a incubação, os inóculos foram submetidos a purificação de DNA plasmidial pelo kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) ou *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel) seguindo as orientações do fabricante. Os plasmídeos obtidos foram quantificados e tiveram a identidade confirmada por digestão enzimática, seguida da eletroforese em gel de agarose. Aqueles cuja identidade foi confirmada, foram devidamente identificados e armazenados a – 20°C.

4.2.2 Digestão enzimática

Digestões enzimáticas foram utilizadas para confirmação de identidade das construções e subclonagem de genes em novos plasmídeos. Para a confirmação de identidade, utilizou-se um volume final de reação de 20µL,

contendo 2 µl de BSA (1mg/mL), 2 µL de Buffer específico para a combinação de enzimas escolhida, 1 µL de cada enzima, 1 µg de DNA e qsp. 20 µL de H₂O Mili-Q. As incubações foram usualmente realizadas por 2h a 37 °C, podendo ser estendidas overnight. Para digestões em que se realizaria a purificação dos fragmentos obtidos a partir de um gel de agarose, utilizou-se, os mesmos volumes de reagentes, modificando apenas a quantidade de DNA para 2 µg e sempre fazendo a incubação overnight. As reações foram realizadas em tubos de 0,2 mL de polipropileno e avaliadas por eletroforese em gel 0,7% de agarose.

4.2.3 Eletroforese em gel de agarose.

Para análise de fragmentos obtidos após as digestões e avaliação de DNA, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,7% diluída em TAE* corado com SyberSafe(Invitrogen). As amostras eram acrescidas de *DNA loading Dye* (ThermoFisher) e submetidas a eletroforese a 100 V por aproximadamente 40min. Finalizada a eletroforese, os resultados eram registrados em fotodocumentador *ChemiDoc™ Touch* (BIO-RAD).

4.2.4 Subclonagem de plasmídeos por ligação dos produtos de digestão

Para a subclonagem de genes em outros plasmídeos, procedeu-se a digestão enzimática do inserto e plasmídeo com as mesmas combinações de enzimas de restrição, levando a formação de extremidades homólogas. Os fragmentos foram posteriormente foram ligadas utilizando a T4 DNA ligase (Promega™) de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando 1:5 de plasmídeo em relação ao inserto (50ng de template: 250ng de inserto). O volume final de reação foi de 20 µL contendo 2µL de BSA (1mg/mL), 2µL de T4 DNA ligase e H₂O Milli-Q qsp. 20µL. A reação ocorreu num protocolo de 1h a 22°C e 16h overnight.

4.3 Cultivo celular

A expressão dos genes da proteína de envelope dos sorotipos do vírus da Dengue e da proteína E2 do vírus Chikungunya foi realizada em células eucariotas das linhagens HEK293T e/ou EXPI293. As células eram mantidas em

estufa de acordo com as demandas específicas e todo processo de manipulação foi executado em cabines de biossegurança (VECO), a cada 3 a 4 dias de crescimento, de acordo com a densidade e viabilidade celular.

4.3.1 HEK293T

A linhagem HEK293T foi cultivada aderida, em meio contendo SFB. O cultivo se deu em estufas incubadoras de CO₂ *Elite II* (REVCO) com 5% de CO₂ a 37°C. O meio utilizado foi DMEM (Sigma) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (ThermoFisher) e 1% pen/Strep (Sigma). Durante a etapa de expressão para a avaliação em Western Blot, a célula foi submetida a troca de meio para o *Opti-MEM* (ThermoFisher), uma vez que as altas concentrações de SFB levam a ligações inespecíficas em ensaios de Western-Blot.

Essas células foram cultivadas em garrafas T25 e T75 de acordo com a demanda do experimento. Para o repique, o sobrenadante era descartado e as células incubadas em tripsina (Sigma) por aproximadamente 5 min. Após suspensas na tripsina eram adicionadas de DMEM 10% SFB para neutralização e centrifugadas a 1200 rpm por 5min. O pellet de célula gerado era ressuspensionado em meio fresco para contagem. 3×10^5 células eram repicadas para manutenção ou quantidades estabelecidas de acordo com a demanda dos ensaios posteriores. A viabilidade celular foi avaliada por *Trypan Blue* (ThermoFisher) em contador automático *Countess II FL* (ThermoFisher).

4.3.2 EXPI293

As Células EXPI293 (*ThermoFisher*), derivadas de HEK293 são células altamente transfectáveis e capazes de gerar rendimentos proteicos superiores em comparação com linhagens celulares 293 padrão, de acordo com o fornecedor. Elas crescem em suspensão, em meio quimicamente definido e livre de soro fetal bovino *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher). As condições padrão de cultivo foram de 37°C, 8% de CO₂, 75% de umidade, na rotação de 85RPM em incubadora com agitador orbital Minitron (INFORS HT). Essas células foram mantidas em *Erlenmeyers* (ThermoFisher) de 125ml a 1L, comportando um cultivo de cerca de um quarto do seu volume. A linhagem EXPI293 dobra aproximadamente a cada 24h e é repicada a cada 3 ou 4 dias com $3-5 \times 10^5$ células/mL dispensando processo de centrifugação, atingindo a

densidades celulares aproximadas de até 10^7 células/mL. A viabilidade celular foi avaliada por *Trypan Blue* (ThermoFisher) em contador automático *Countess II FL* (ThermoFisher).

4.4 Expressão transiente em células HEK293T e EXPI293

4.4.1 Transfecção de células HEK 293T

Para avaliação inicial da expressão de proteínas em células de mamífero, $7,5 \times 10^6$ células HEK293T cultivadas aderidas a garrafas T25 foram transfectadas com 10µg de DNA plasmidial utilizando *Lipofectamine® 3000* como veículo de transfecção.

Para isso, foram feitos dois mix, o primeiro deles (Mix A) contendo 20µL de p3000 + 10µg de DNA plasmidial + *Opti-MEM qsp. 625µL* e o segundo (Mix B) contendo 37,5µL de *Lipofectamine® 3000 Reagent* + 587,5 µL de *Opti-MEM*. Os mix foram incubados separadamente por 5min, misturados e incubados novamente por mais 20min. A mistura foi gotejada lentamente sobre a cultura de células HEK293T cujo meio já havia sido trocado para 3,75mL de meio *Opti-MEM* previamente ambientado a 37°C.

Para evitar a interferência das altas concentrações de soro, que suplementam o meio DMEM (10% SFB) em análises posteriores, após a transfecção, a cultura foi mantida em meio *Opti-MEM* (ThermoFisher) por 24h e 48h.

4.4.2 Transfecção de células EXPI293

A transiente em células EXPI293 foi realizada por meio da transfecção com o veículo *ExpiFectamine® 293 Reagent* (ThermoFisher™) e o meio *EXPI293® Expression Medium* (ThermoFisher™).

$7,5 \times 10^7$ células cultivadas em 25mL de meio foram transfectadas com 25 µg de DNA seguindo as orientações do fabricante. Foram feitos dois mix, o primeiro deles (Mix A) contendo 25µg de DNA plasmidial + 1,5mL *EXPI293® Expression Medium* e o segundo (Mix B) contendo 80µL de *ExpiFectamine® 293*

Reagent + 1,4mL de meio *EXPI293® Expression Medium*. Os mix foram incubados separadamente por 5min, misturados e incubados novamente por mais 15min. A mistura foi gotejada lentamente sobre a cultura de células.

24h após a transfecção, as culturas foram acrescidas de 150µL de *Enhancer 1* e 1,5mL de *Enhancer 2*. Após a adição dos *enhancers* as culturas foram mantidas por 4 dias ou até que a viabilidade fosse menor do que 80%.

4.5 Expressão estável utilizando pcDNA 3.1(+) em EXPI293

Para induzir a expressão estável das proteínas de interesse, 24h após a adição do *enhancer*, as culturas previamente transfectadas com pcDNA 3.1 foram selecionadas com o antibiótico aminoglicosídeo, cujo gene de resistência está presente no plasmídeo: G418 – Geneticina. Após a seleção, o manejo adequado das células foi realizado de acordo com as demandas para recuperação da viabilidade.

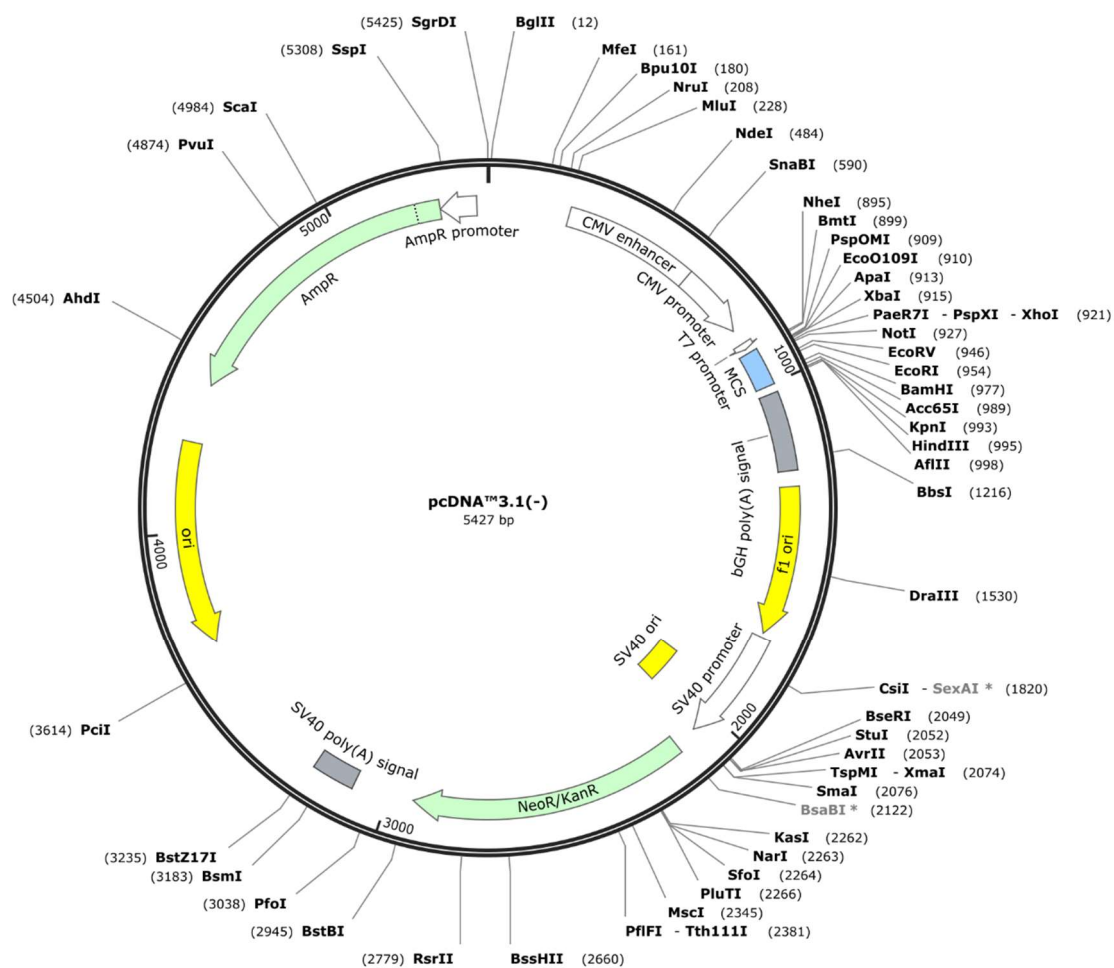


Figura 5 - Mapa do vetor pcDNA3.1(+). Em branco estão as sequências dos promotores. A sequência do promotor CMV está a montante do sítio múltiplo de clonagem, regulando a expressão do gene de interesse, enquanto o promotor SV40 está a montante do gene de resistência a aminoglicosídeos, como Neomicina, Kanamicina e Geneticina. As demais sequências têm a sua função associada a replicação do DNA plasmidial e amplificação em bactérias.

4.6 Expressão estável utilizando vetor viral

4.6.1 Vetor viral e plasmídeos associados

Para a montagem das partículas é necessário realizar a cotransfecção dos três plasmídeos lentivirais: pLVX-puro, p.CMV.VSV-G e psPAX2, cujas funções estão descritas nos itens abaixo e os mapas representados nas figuras 2, 3 e 4.

4.6.1.1 pLVX puro

O plasmídeo pLVX puro é responsável pela transferência do gene que codifica a proteína de interesse para a partícula viral, que fará a transdução, permitindo a integração dessa sequência no genoma e expressão constitutiva. Nele estão presentes outras sequências importantes para a expressão desse gene. As sequências dos promotores CMV (Citomegalovírus) e PGK (*Phosphoglycerate kinase*), que regulam respectivamente a expressão do gene de interesse e do gene de resistência à puomicina. As sequências WPRE (*Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory elemento*) e RRE (*Rev Response Element*), que são elementos que atuam, respectivamente aumentando a estabilidade dos transcritos de mRNA do vírus (Pavlakakis GN, Felber BK, 1990) e no transporte eficiente de genomas de RNA viral não processados do núcleo para o citoplasma para montar adequadamente as partículas do lentivector (Oh T, Bajwa A, Jia G, Park F., 2007). A sequência cPPT (Central polypurine tract), que é o sítio de reconhecimento para transcrição reversa e HIV-1 Ψ , que é o sítio alvo para empacotamento do nucleocapsídeo. LTRs (*Long terminal repeats*), flanqueiam a sequência a ser transduzida, sendo 5' LTR envolvida na transcrição. Além do sinal de poliadelinação de SV40 (SV40 poly(A)signal).

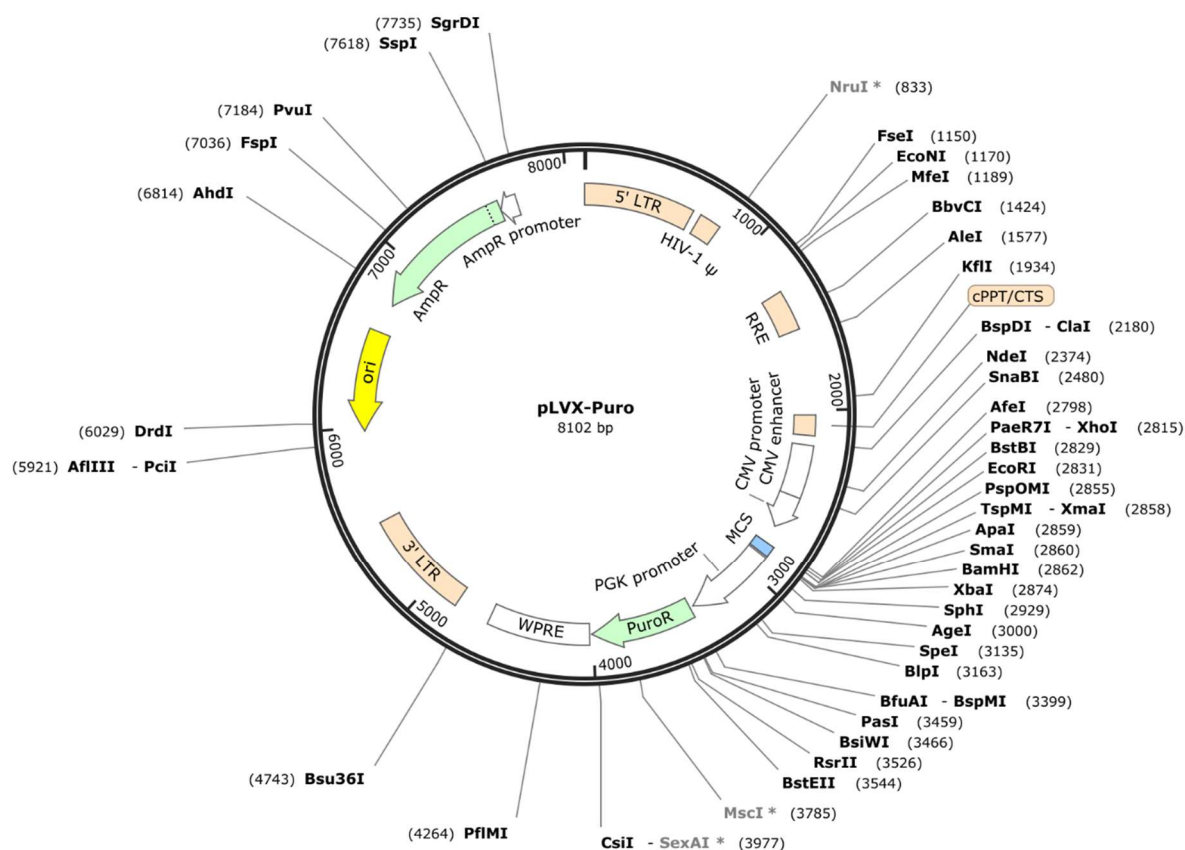


Figura 6 - Mapa do vetor pLVX-puro. A sequência do promotor CMV, está a montante do MCS – sítio múltiplo de clonagem, em português. O promotor PGK (Phosphoglycerate kinase) está a montante do gene de resistência a puomicina, em verde (PuroR). Long terminal repeats; RRE: Rev Response Element; cPPT: Central polypurine tract; MCS: multiple cloning site; WPRE: Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; Ori: origem de replicação. Adaptado: Snapgene (Dotmatics).

Para aplicação da estratégia utilizando vetor viral, 5 novos plasmídeos pLVX foram construídos. Todos os insertos correspondentes aos genes de interesse foram retirados do plasmídeo pcDNA3.1. Para RFP a digestão foi realizada com XbaI e XhoI, para os genes codificadores das proteínas E e de DENV1, 2 e 4 a digestão foi realizada com XhoI e BamHI e com EcoRI e BamHI para o gene codificador da proteína E de DENV3. O plasmídeo pLVX, que corresponde ao plasmídeo para clonagem dos insertos foi digerido com as mesmas enzimas utilizadas para cada gene.

Após a digestão e eletroforese, os fragmentos foram cuidadosamente extraídos do gel de agarose, pesados e submetidos a purificação pelo kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel). Após a purificação foram quantificados e submetidos a ligação com *T4 DNA Ligase* (Promega) na razão 5:1 de inserto para vetor, incubados por 1h a 22°C overnight a 16 °C. O volume final de ligação, de 20 µl, foi utilizado para transformar XL1-Blue, as colônias crescidas no meio de seleção foram inoculadas e submetidas a extração plasmidial. Os plasmídeos obtidos foram confirmados por digestão e avaliados por eletroforese em gel de agarose.

4.6.1.2 pCMV.VSV.G

Plasmídeo que codifica a expressão da proteína de envelope do vírus da Estomatite Vesicular humana, que tem afinidade por múltiplos receptores presentes em células humana e aumenta a probabilidade de adsorção da partícula viral nas células alvo.

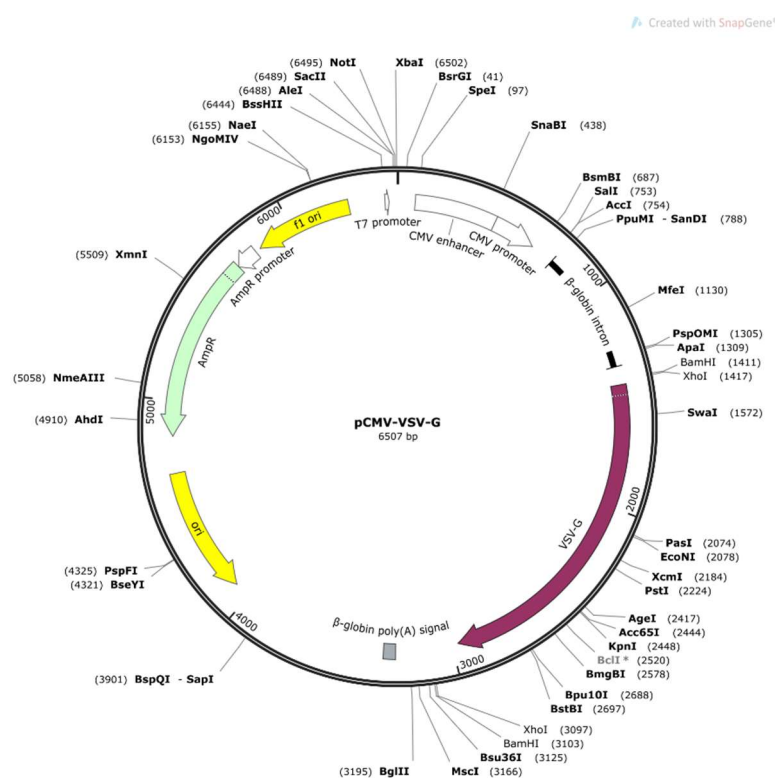


Figura 7 - Mapa do vetor pCMV.VSV-G. A proteína de envelope VSV-G (Vesicular stomatitis virus G) está sob regulação do promotor Em branco, a sequência do promotor CMV. O sinal de poliadenilação de β -globina (β -globin poly(A) signal), em cinza, está a jusante do gene VSV-G.

4.6.1.3 psPAX₂

Plasmídeo que contém sequências essenciais para a funcionalidade da partícula, como os genes estruturais gag, que codifica a expressão das proteínas de matiz, capsídeo e núcleo capsídeo e pol, que codifica a expressão da protease viral (PRO), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN).

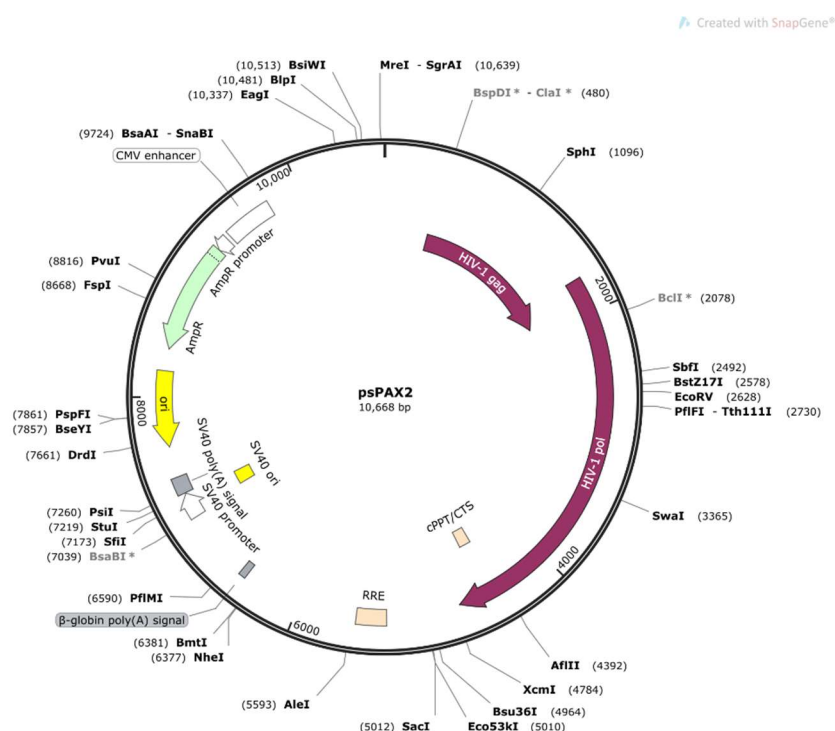


Figura 8 - Mapa do vetor psPAX₂. A sequência do promotor CMV está a montante, regulando a expressão dos genes estruturais gag e pol do HIV-1.

4.6.2 Montagem do vetor viral em HEK293T

Células HEK293T aderidas foram co-transfectadas utilizando *Lipofectamine® 3000* como veículo de transfecção e uma proporção de 1:1:1 dos plasmídeos para montagem do vetor viral 2,5 µg de pCMV.VSV,G; 2,5 µg de psPAX₂ e 2,5 µg de pLVX+ gene de interesse, respectivamente, totalizando 7,5µg de DNA plasmidial. Após montagem no interior das células as partículas virais são exocitadas para o sobrenadante, por isso, para evitar a interferência das altas concentrações de soro fetal bovino, que suplementam o meio DMEM (10% SFB), e que poderiam interferir no processo de adsorção do vírus nas células alvo, durante e após o processo de transfecção, a concentração final de

soro fetal bovino no meio DMEM foi reduzida para 2,5%. 24h e 48h após a transfecção os sobrenadantes foram coletados, filtrado em filtro de seringa de 0,45µm para remoção de restos de células e utilizado para transduzir uma nova cultura de HEK293T ou congelados e armazenados em freezer a -80°C.

4.6.3 Montagem do vetor viral em EXPI

Células EXPI 293 foram co-transfectadas utilizando *ExpiFectamine® 293 Reagent* (ThermoFisher™) como veículo de transfecção e uma proporção de 2:2:1 dos plasmídeos para montagem do vetor viral 10 µg de pCMV.VSV,G; 10 µg de pspAX₂ e 5 µg de pLVX+ gene de interesse, respectivamente, totalizando 25µg de DNA plasmidial 24h após a transfecção foram adicionados os *Enhancers* 1 e 2. Após montagem no interior das células as partículas virais são exocitadas para o sobrenadante, por isso, 48h após a transfecção os 30 mL aproximados de meio foram coletados, centrifugados e o pellet de células ressuspenso em *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher) novo, para nova coleta 72h após a transfecção. Todos os sobrenadantes contendo vetores virais foram centrifugados a 1200 RPM e filtrados a 0,45 µm para remoção de restos de células e utilizado para transduzir uma nova cultura de HEK293T ou congelados e armazenados em freezer a -80°C.

4.6.4 Concentração das partículas virais utilizando filtro Amicon

Para aumentar a eficiência de transdução, utilizando uma maior proporção de partículas virais, o sobrenadante coletado das culturas passou a ser concentrado utilizando coluna Amicon de 30kDa. O sobrenadante foi centrifugado a 5000 g em ciclos de 10 min. As partículas virais, que apresentam tamanho maior do que 30kDa, ficam retidas no filtro, o volume final é ajustado para 2mL, a coluna é vortexada e a membrana gentilmente lavada, para desprender todas as partículas que ficaram retidas. Esses 2mL foram coletados e utilizados para a transdução

4.6.5 Transdução

4.6.5.1 Transdução de células HEK293T

Para a transdução 5×10^6 células HEK293T aderidas em garrafas T25 tinham o meio retirado e substituído por 2mL de sobrenadante contendo partículas virais montadas, também em células HEK293T + 20 μ g de *Polybrene* (polímero catiônico que neutraliza as cargas na superfície viral e celular para aumentar a eficiência de adsorção). As células eram delicadamente agitadas a 40RPM durante 1h. Após esse período o volume final era completado para 5mL com meio DMEM + 2,5% SFB+ 1%PenStrp. 24 e 48h após a transdução eram coletadas amostras de sobrenadante e então as células eram repicadas na presença de antibiótico de seleção puromicina (ThermoFisher) 2 μ g/mL.

4.6.5.2 Transdução de células EXPI296

Para a transdução 5×10^6 células EXPI293 eram centrifugadas e ressuspensas em 2mL sobrenadante concentrado contendo partículas virais montadas, também em células EXPI293+ 20 μ g de *Polybrene*. A adsorção era feita sob agitação de 300 rpm por 1 h. Após a adsorção, o volume era completado para 5 mL e transferido para uma garrafa T25, mantida sob baixa agitação de 60 RPM a 37°C e 5% CO₂. 24h após a transdução, as células eram centrifugadas e ressuspensas em 25mL de meio *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher) novo o suplementado 2 μ g/mL de antibiótico de seleção puromicina (ThermoFisher).

4.7 PCR

Para confirmação da transdução, o DNA genômico das células foi extraído utilizando kit *QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen)*. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop* (ThermoFisher) e 100 ng de cada amostra foram submetidas à reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos para cada sequência (Anexo 2). Na PCR, além dos DNAs foram utilizados 0,5 μ L da enzima GoTaq® DNA polimerase, 4 μ L de buffer, 2 μ L de DNTP, 1 μ L de cada iniciador e 1 qsp. de H₂O Milli-Q. Uma amostra branca (sem DNA) foi submetida as mesmas condições para avaliar possíveis

contaminações. A reação de PCR ocorreu em termociclador com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 1 min; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento em temperatura determinada de acordo com os primers por 30s e alongamento a 72°C por 30s min; alongamento final 72°C por 10 min.

4.8 Concentração dos sobrenadantes após a expressão da proteína.

Os sobrenadantes das células eucariotas transfectadas ou transduzidas com os genes de interesse por vezes precisaram ser concentrados, devido à baixa concentração de proteína expressa, para que fossem posteriormente analisados por SDS-PAGE e Western Blot. Filtros Amicon (Merck) de 30kDa foram utilizados para essa finalidade com centrifugações a 5000 g em ciclos de 10 min até que se atingisse o volume final esperado. Outra metodologia foi a purificação utilizando bead de *Ni-NTA Agarose* (QIAGEN) em que 500 µl de sobrenadante foram incubados com 50 µL de beads por 2h sob agitação, em seguida foram centrifugados a 1200 rpm. As proteínas ligadas às beads que ficaram no pallet foram eluídas em tampão contendo imidazol. As amostras finais concentradas ou purificadas foram acrescidas de tampão de amostra e fervida a 96°C por 5min para desnaturação das proteínas que foram, então analisadas em SDS-PAGE

4.9 Expressão da proteína E₂ de CHIKV em BL21 e purificação por cromatografia de afinidade

Plasmídeo sintético contendo o gene de interesse (pET-21_CHIKV-E₂) foi utilizado para transformar bactérias da linhagem XL10 para manutenção do estoque, extração do DNA plasmidial e confirmação de identidade por restrição com enzimas. Esses experimentos já foram realizados anteriormente conforme descrito em BAGNO, 2021. Após a confirmação da identidade, os plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias da linhagem BL21, conforme o item 4.2.1. Dois clones foram utilizados para inóculo em 250mL de meio LB e procedeu-se a expressão a 37°C, 4h, 0,5 mM IPTG. Após centrifugação (20min, 8.000 g, 4°C), o sedimento foi homogeneizado em 25mL de tampão de lise gelado e as amostras foram submetidas ao homogeneizador de alta pressão (Emulsiflex, Avestin, Canadá) nas condições de 7.000 a 10.000psi, repetindo-se

o processo por três vezes. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação (40.000g, 30 min, 4°C) e as proteínas, que se apresentaram na fração insolúvel, foram solubilizadas overnight em tampão com 8M de uréia*. Após nova centrifugação (40.000g, 30 min, 4°C) o sobrenadante foi utilizado para a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel HisTrap™ *High Performance* (Cytiva™). Os tampões A e B* variaram em função da presença de uréia, porém o protocolo utilizado foi o mesmo descrito no item 4.12 em aparelho ÄKTA Pure™ Protein Purification System (Cytiva™).

4.10 SDS-PAGE

Os sobrenadantes obtidos após a expressão proteica foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida.

A matriz utilizada em SDS-PAGE é composta por dois géis. O primeiro deles, menos concentrado: gel de empilhamento, proporciona um alinhamento das amostras, e o segundo: gel de separação ou resolução, permite que as proteínas sejam separadas de acordo com o peso molecular durante a eletroforese.

O gel de empilhamento foi preparado em uma concentração de 4% de acrilamida/bis-acrilamida, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 0,1% de SDS, 0,5% de APS e 0,2% TEMED. O gel de separação, no qual de fato é possível observar as diferentes proteínas em bandas de tamanho comparável com o padrão, foi preparado em uma concentração 12,5% de acrilamida/bis-acrilamida, acrescida de Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 0,1% de SDS, 0,5% de APS e 0,05% de TEMED. O gel de empilhamento consistiu em 4% de acrilamida, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 0,5% de APS, 0,1% de SDS e 0,2% TEMED.

As amostras a serem analisadas foram previamente preparadas com tampão de amostra* e fervidas por 5min a 96°C para completa desnaturação das proteínas. Essas amostras eram aplicadas no gel imerso em tampão de corrida* nas cubas (*Biorad*) e submetidos a corrente de 120 V por cerca de 30 min, seguidos de 150V por aproximadamente 1h e 10min.

Após a eletroforese, os géis foram corados com *Instant Comassie* (Abcam) por cerca de 20 min ou *Comassie Brilliant Blue** por 40 min, seguido de solução descorante* trocada sempre que coloração da solução se igualava a do gel, até a remoção do background. Os padrões *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Biorad) ou *PageRuler™* (Thermo Scientific) foram utilizados para comparação de pesos moleculares.

4.11 Western Blot

Ensaio de Western Blot foram utilizados para detecção das proteínas de interesse nos sobrenadantes, já que essas proteínas apresentavam baixo rendimento de expressão e essa técnica demonstra uma maior sensibilidade.

As amostras foram inicialmente submetidas a SDS-PAGE, e ao final da corrida as proteínas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose *Amersham™* (Cytiva), também por meio de eletroforese, dessa vez 350 mA por 2h em tampão de transferência*. Ao final da eletroforese a membrana de nitrocelulose foi corada com *Ponceu* para confirmar a transferência e em seguida lavada com TBS-T*. Após a visualização das proteínas no *Ponceu*, a membrana foi incubada em solução de bloqueio*+ 2,5% de Leite em pó*, por 1h ou overnight. Após o bloqueio a membrana foi lavada em TBS-T + 0,5% de leite.

Para detecção das proteínas de interesse alguns anticorpos foram utilizados como primários: Anticorpo primário mouse *Anti-6x His Tag* (Sigma) diluição 1:2000; Anticorpo primário mouse Anti flavivírus 4G2 1:500; Anticorpo primário mouse anti proteína de Envelope de DENV1-4 (Sigma) 1:500; anticorpo primário Anti-His (C-Term) –HRP (*life technologies*) 1:2000 ou anticorpo primário rabbit anti-E2 1:1000. Todas as incubações em anticorpo primário se deram por 1h, e após as lavagens procedeu-se, quando necessário a incubação com anticorpos secundários: anti-mouse diluição 1:2000 (Sigma) ou *Anti-Rabbit IgG* 1:100.000 (Sigma) conjugados com peroxidase por 1h. A revelação da membrana foi feita com luminol, utilizando o kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (Cytiva), e a quimioluminescência gerada foi documentada no *ChemiDoc™ Touch* (BIO-RAD).

4.12 Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade em colunas de níquel

Após a confirmada a expressão das proteínas de interesse, por Western Blot, os sobrenadantes foram submetidos a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Duas diferentes colunas foram avaliadas *HisTrap excel* (GE Healthcare Life Sciences) e *HisTrap™ High Performance* (Cytiva™). Os tampões A e B* e protocolo utilizado para ambas durante a purificação foram os mesmos em aparelho ÄKTA Pure™ Protein Purification System (Cytiva™).

Para iniciar o processo, a coluna armazenada em etanol 20% foi lavada com água e ambientada com solução de ligação (Tampão A*), a amostra de sobrenadante foi aplicada e a fração não ligada foi coletada para posteriores análises. Após a passagem do sobrenadante, a coluna foi lavada com tampão A para remoção de ligações inespecíficas e em seguida procedeu-se a etapa de eluição em gradiente de 0-100% com tampão de eluição (tampão B) contendo 500mM de Imidazol*. Os produtos da purificação foram analisados em novo gel SDS-PAGE e quantificados utilizando o kit *Randox Up*, seguindo as recomendações do fabricante.

4.13 ELISA

Para avaliar o potencial antigênico das proteínas produzidas em células de mamífero, comparar lotes e compará-las com outros possíveis antígenos, foram realizados ensaios de ELISA indireto.

Placas de microtitulação de poliestireno tratadas para adsorção passiva foram sensibilizadas overnight a 4°C com 100 µL de tampão carbonato (pH 9,6)* em que foi diluída a proteína purificada em duas diferentes concentrações de acordo com o teste a ser realizado. Para avaliação de anticorpos IgM foram utilizados 800 ng por poço para sensibilização, enquanto para anticorpos IgG foram utilizados 200 ng por poço. Após a incubação, as proteínas ficaram adsorvidas à placa e solução de sensibilização foi descartada. Os poços foram bloqueados por 2 h a 25°C, utilizando 250 µL da solução de bloqueio*, que foi posteriormente descartada.

Para esses ensaios foram utilizadas amostras de soro humano diluídas em solução diluente* 1:25, para avaliação de IgM, e 1:100 para avaliação de IgG.

Em cada poço foram adicionados 100µL de soro previamente diluído e as placas foram incubados a 37°C por 60min. Em seguida, foram lavadas cinco vezes em lavadora de Microplacas Wellwash Versa (Thermo Scientific™) com solução de lavagem*.

Os anticorpos secundários utilizados nesses ensaios foram anti-human IgG, Sigma A0170 ou anti-human IgM, Sigma A0420, ambos conjugados à enzima peroxidase. Os anticorpos foram previamente diluídos em estabilizante (Moss, Ref. HRPD1000) 1:60.000 para a detecção de IgG e 1:40.000 para detecção de IgM. Após a lavagem, adicionou-se 100µL do anticorpo secundário, sendo incubados a 37 °C por 30 min. As placas foram novamente lavadas cinco vezes e incubadas com 100µL de TMB por poço (3,3', 5,5; -tetrametilbenzidina) (Scienco, Ref. One Step), ao abrigo de luz, por 20 minutos. Ao final do processo a reação foi interrompida com 100 µL de solução de parada* e absorbância medida em espectrofotômetro *Multiskan GO* (Thermo Fisher Scientific) a uma densidade óptica (O.D.) de 450 nm.

4.14 Análises dos resultados de ELISA

Os gráficos foram gerados pelo programa *GraphPad Prism 8* (Dotmatics) e as análises realizadas com base em curva ROC (Receiver Operating Characteristic), uma ferramenta gráfica usada em estatística para avaliar o desempenho de um modelo de classificação binária. Ela mostra a relação entre a taxa de verdadeiros positivos (TPR) e a taxa de falsos positivos (FPR) em diferentes pontos de corte.

- Verdadeiro Positivo (TP): Quando o modelo classifica corretamente um exemplo como positivo.
- Falso Positivo (FP): Quando o modelo classifica erroneamente um exemplo negativo como positivo.
- Taxa de Verdadeiros Positivos (TPR) ou sensibilidade: Proporção de amostras positivas, que foram corretamente classificados pelo modelo.
- Taxa de Falsos Positivos (FPR): Proporção de amostras negativas, que foram incorretamente classificados como positivos pelo modelo.

O eixo X representa o FRP e o eixo Y representa o TRP. A área sob a curva (AUC) é calculada como uma métrica resumida do desempenho do teste.

Quanto maior a AUC, melhor o desempenho do modelo. Quanto mais a curva ROC se aproxima do canto superior esquerdo, melhor o desempenho do modelo, pois isso indica que ele tem altas taxas de verdadeiros positivos e baixas taxas de falsos positivos.

O valor de *cut-off* foi calculado pela média de soros verdadeiramente negativos acrescida de três vezes o valor do desvio padrão (3DP) (Bagno, 2020) e a partir do *cut-off* determinou-se um índice (I) de classificação dos resultados, baseado na absorbância (Abs) de cada amostra (Abs 450 nm), dividida pelo valor do *cut-off*. Se o índice encontrado estava abaixo de 0,8 a amostra foi considerada negativa, se ele estava acima de 1,1 a amostra foi considerada positiva. Índices entre 0,8 e 1,1 caracterizavam a amostra como indeterminada.

A especificidade dos testes foi calculada pelo número de amostras consideradas negativas pelo teste dentre as amostras sabidamente negativas.

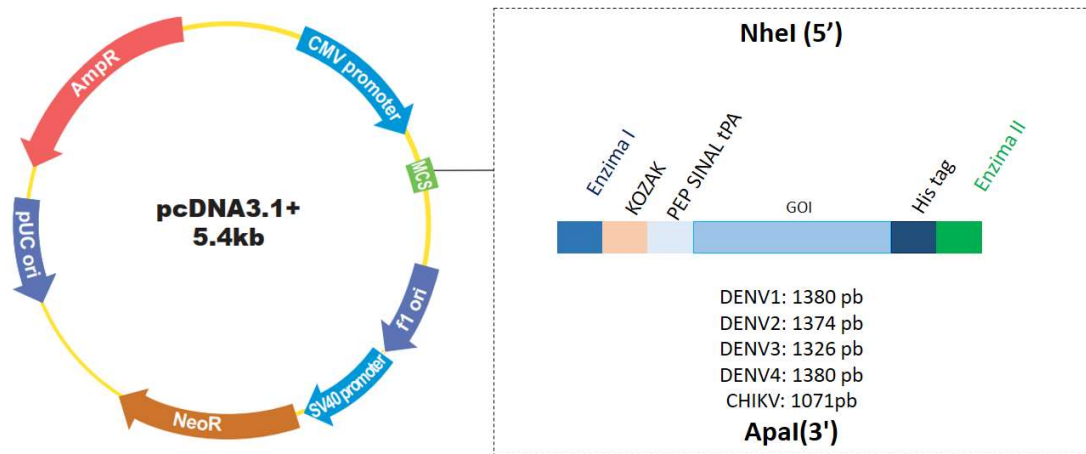
As amostras classificadas como indeterminadas não foram utilizadas para os cálculos de sensibilidade e especificidade.

* Todas as soluções utilizadas e citadas na metodologia constam no anexo C.

5. RESULTADOS

5.1 Síntese dos genes E de DENV 1-4 e E₂ de CHIKV

As sequências dos genes que codificam a expressão da proteína de Envelope dos 4 sorotipos do vírus da Dengue foram obtidas a partir de trabalhos anteriores do grupo (Quinan, 2014; Oliveira, 2019). O mesmo ocorreu para a proteína E2 do Vírus Chikungunya (Bagno, 2020; Queiroz, 2023). Para expressão em células eucariontes, algumas modificações foram realizadas: A região transmembrana foi removida. Os tamanhos finais das regiões codificadoras dos genes sintetizados foram de: 1209pb; 403AA e 45kDa para DENV1 e DENV3; 1257pb; 419AA e 46,5kDa para DENV2 e DENV4; 1074pb; 358AA e 39,8kDa para CHIKV. Antecedendo a região N-terminal foram incluídas a sequência Kozak, para facilitar a interação do mRNA com o ribossomo, e o peptídeo sinal derivado do gene do tPA (ativador de plasminogênio tecidual) para secreção proteica. A sequência codificadora da cauda de histidina (6x HIS) foi acrescentada na região C-terminal das sequências, visando permitir a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, e ao final da sequência do gene, após a cauda de histidina, foi incorporado um códon de terminação. Adicionalmente, sítios de clivagem para enzimas de restrição foram introduzidos, flanqueando o gene construído para liberação do inserto. Todos os cassetes de expressão foram clonados entre os sítios de restrição para NheI e ApaI no plasmídeo pcDNA3.1(+). A representação esquemática do vetor pcDNA3.1 e das sequências dos genes de interesse (GOI) está demonstrada na figura 9A e as sequências de nucleotídeos dos genes, com as indicações das modificações inseridas, estão apresentadas nas figuras 9B; 9C; 9D; 9E e 9F.



KOZAK: **GCCACC**

His tag: **CATCACCATCACCATCAC**

Peptídeo sinal: **tPA (ativador de plasminogênio tecidual)**

Enzimas de restrição

Primers utilizados em PCR

B >DENVI - Enzimas: **XhoI** (CTCGAG) e **BamHI** (GGATCC)

CTCGAGGCCACCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCT
GTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCAGCCAGGAAATCCATGCCCGATTGAGAAGAGGAG
CCAGACGATGCGTGGAATAGGCAATAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACG
 TGGGTGGACGTGGTACTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAACAACC
 AACATTGGACATTGAACTCTTGAAAACGGAGGTCACGAACCCTGCCATCCTGCGCAAAC
 TGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACACCACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGA
 GAAGCCACACTGGTGGAAGAACAAGACGCGAACTTTGTGTGTGTCGACGGACGTTCTGTGA
 CAGAGGCTGGGGTAATGGCTGCGGACTATTTGGAAAAGGAAGTCTACTGACGTGTGCTA
 AGTTCAAGTGTGTGACAAAACCTCGAAGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTTAAAATAT
 TCAGTGATAGTCACTGTCCACACTGGGGACCAGCACCAGGTAGGAAACGAGACTACAGA
 ACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCTACGTCGGAAATACAGCTGACCG
 ACTACGGAGCCCTCACATTGGACTGCTCACCTAGAACTGGGCTGGACTTTAATGAGATG
 GTGCTACTGACAATGAAAGAAAAATCATGGCTTGTCCACAAACAATGGTTTCTAGACTT
 ACCACTGCCTTGGACTTCGGGAGCTTCAACATCCCAAGAGACTTGGAACAGACAAGATT
 TGCTGGTCACATTCAAGACAGCTCATGCAAAGAAACAGGAAGTAGTCGTGCTGGGATCA
 CAGGAAGGAGCAATGCACACTGCGCTGACTGGGGCGACAGAAATCCAGACGTCAGGAAC

GACAACAATTTTTGCGGGACACCTGAAATGTAGACTAAAAATGGACAACTGACTTTAA
 AAGGGATGTCATATGTGATGTGCACAGGCTCATTTAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAG
 ACCCAGCATGGAAGTGTTTTAGTGCAGGTAAATACGAAGGAACAGACGCACCATGCAA
 GATCCCTTTTCTGACCCAAGATGAAAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAG
 CTAATCCTATAGTTACTGATAAAGAAAAACCAGTCAACATTGAGACAGAACCACCTTTT
 GGTGAGAGCTACATCGTGGTAGGGGCAGGTGAAAAAGCTTTGAAACTAA **GCTGGTTCAA**
GAAAGGAAGCAGC **CATCACCATCACCATCAC** **TAG** **GGATCC**

C > DENV2 - Enzimas: **XhoI** (CTCGAG) e **BamHI** (GGATCC)

CTCGAGGCCACC **ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCT**
GTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCAGCCAGGAAATCCATGCCCGATTGAGAAGAGGAG
CCAGAGCCTTGATTTTCATCTTACTGACAGC **TGTCGCTCCTTCAATGACAA**TGCGCTGC
 ATAGGAATATCAAATAGAGACTTCGTAGAAGGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTGACAT
 CGTCTTAGAACATGGAAGTTGTGTGACGTCCATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGATT
 TTGAACTGATAAAAAACAGAAGCCAAACAACCTGCCACTCTAAGGAAGTACTGTATAGAA
 GCAAAGCTGACCAACACAACAACAGAATCGCGTTGCCCAACACAAGGGGAACCCAGTCT
 AAATGAAGAGCAGGACAAAAGGTTTCATCTGCAAACACTCCATGGTAGACAGAGGATGGG
 GAAATGGATGTGGATTATTTGGAAAGGGAGGCATTGTGACCTGTGCTATGTTTACATGC
 AAAAAGAACATGGAAGGAAAAGTCGTGCAGCCAGAAAATTTGGAATACACCATCGTGAT
 AACACCTCACTCAGGAGAAGAGCACGCTGTAGGTAATGACACAGGAAAGCATGGCAAGG
 AAATCAAATAACACCACAGAGTTCCATCACAGAAGCAGAAGTACAGGCTATGGCACT
GTCACGATGGAGTGCTCTCCGAGAACGGGCCTCGACTTCAATGAGATGGTGCTGCTCCA
 GATGGAAGACAAAGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGGTTCCTAGACCTGCCGTTACCAT
 GGCTACCCGGAGCGGACACACAAGGATCAAATTGGATACAGAAAGAGACATTGGTCACT
 TTCAAAAATCCCCACGCGAAGAAACAGGATGTCTGTTAGGGTCTCAAGAAGGGGC
 CATGCACACGGCACTCACAGGGGCCACAGAAATCCAGATGTCATCAGGAACTTACTGT
 TCACAGGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGAATGGACAACTACAGCTCAAAGGAATGTCA
 TACTCTATGTGTACAGGAAAGTTTAAATTTGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAACATGG
 AACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGACGGTTCTCCATGTAAGATCCCTTTTG
 AGATAACAGATTTGGAAAAAGACACGTCTTAGGTCGCCTGATTACAGTTAACCCAATC
 GTAACAGAAAAAGATAGCCCAGTCAACATAGA **AGCAGAACCTCCATTTCGGA**GACAGCTA
 CATCATCGTAGGAGTAGAGCCGGGACAACCTGAACTCAATTGGTTTAAAGAGGGAAGTT
 CC **CATCACCATCACCATCAC** **TAG** **GGATCC**

D >DENV3 - Enzimas: **Sal I** (GTCGAC) e **BamHI** (GGATCC)

GTCGACGCCACCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCT
 GTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCAGCCAGGAAATCCATGCCCGATTTCAGAAGAGGAG
 CCAGAAGATGTGTGGGAGTAGGAAACAGAGATTTTGTGGAAGGTCTATCAGGAGCTACG
 TGGGTTGACGTGGTGCTCGAGCACGGAGGGTGTGTGACTACCATGGCTAAGAACAAGCC
 AACGTTGGATATCGAGCTTCAGAAGACCGAGGCCACCCAATTGGCGACCCTAAGGAAGC
 TATGCATTGAGGGGAAAATTACCAACATAACAACCTGACTCAAGATGTCCTACCCAAGGG
 GAAGCGGTTTTGCCTGAGGAGCAGGACCAGAACTACGTGTGTAAGCATAACATACGTAGA
 CAGAGGCTGGGGGAACGGATGTGGTTTGTGGCAAGGGAAGCTTGGTAACATGTGCGA
 AATTTCAATGCCTGGAACCAATAGAGGGGAAAAGTGGTGCAATATGAGAACCTCAAATAT
 ACCGTCATCATCACAGTGACACAGGAGATCAACACCAGGTGGGAAACGAAACGCAGGG
 AGTCACGGCTGAGATAACACCTCAGGCATCAACCACTGAAGCCATCTTGCCTGAATATG
 GAACCTTGGGTTAGAATGCTCACCACGGACAGGTTTGGATTTCAATGAAATGATCTTG
 CTAACAATGAAGAACAAAGCATGGATGGTACATAGACAATGGTTTTTTGACCTACCTCT
 ACCATGGACATCAGGAGCTACAACGGGAACACCAACCTGGAACAGGAAGGAGCTTCTTG
 TGACATTTAAAAACGCACATGCGAAGAAACAAGAAGTAGTAGTCCTTGGATCGCAAGAG
 GGAGCAATGCATACCGCATTGACAGGAGCCACAGAAATCCAAAACCTCAGGAGGCACAAG
 TATTTTTGCGGGGCACTTAAAATGCAGACTTAAGATGGACAAATTGGAACCTCAAGGGGA
 TGAGCTATGCAATGTGCACGAATACCTTTGTGTTGAAGAAAGAAGTCTCAGAAACGCAG
 CATGGGACAATACTCATTAAGGTCGAGTACAAAGGGGAAGATGCACCTTGCAAGATTCC
 TTTCTCCACAGAGGATGGACAAGGGAAAGCTCACAATGGCAGACTGATTACAGCCAACC
 CAGTGGTGACTAAGAAGGACGAGCCTGTCAATATTGAGGCTGAACCTCCTTTTCGGGGAA
 AGTAATATAGTGATTGGAATTGGAGACAACGCCTTGAAAATCAACTGGTATAAGAAAGG
 AAGCTCCCATCACCATCACCATCACTAGGGATCC

E >DENV4 - Enzimas: **XhoI** (CTCGAG) e **BamHI** (GGATCC)

CTCGAGGCCACCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCT
 GTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCAGCCAGGAAATCCATGCCCGATTTCAGAAGAGGAG
 CCAGAAGTGTCTTCTTTGTCCTAATGATGCTGGTCGCCCCATCCTACGGAATGCGATGC
 GTAGGAGTAGGAAACAGAGACTTTGTGGAAGGAGTCTCAGGTGGAGCATGGGTGGACCT
 GGTGCTAGAACATGGAGGATGCGTCACAACCATGGCCCAGGGAAAACCAACCTTGGATT

TTGAACTGACCAAGACAACAGCCAAGGAAGTGGCTCTGTTAAGAACCTATTGCATTGAA
 GCCTCAATATCAAACATAACTACGGCAACAAGATGTCCAACGCAAGGAGAGCCTTATCT
 GAAAGAGGAACAGGACCAACAGTACATCTGCCGGAGAGATGTGGTAGATAGAGGATGGG
 GCAATGGCTGTGGCTTGTGGAAAAGGAGGAGTTGTGACATGTGCGAAGTTCTCATGT
 TCGGGGAAGATAACAGGCAATCTGGTCCAAATTGAGAACCTTGAATACACAGTGGTTGT
 GACAGTCCACAATGGAGACACCCATGCAGTAGGAAATGACACATCCAATCATGGAGTTA
 CAGCCACGATAACTCCCAGGTCACCATCGGTTGAAGTCAAACCTGCCGGACTATGGAGAA
 CTAACACTCGATTGTGAACCCAGGTCTGGAATTGACTTCAATGAGATGATCCTAATGAA
 AATGAAAAAGAAAACATGGCTCGTGCATAAGCAATGGTTTTTGGATCTGCCTCTTCCAT
 GGACAACAGGAGCAGACACATCAGAGGTTCACTGGAATTACAAAGAGAGAATGGTGACA
 TTCAAGGTTCTTCATGCCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTGGGATCTCAGGAAGGAGC
 CATGCATTCTGCCCTCGCTGGAGCCACAGAAGTGGACTCCGGTGATGGAAACCACATGT
 TTGCAGGACATCTCAAGTGCAAAGTCCGTATGGAGAAATTGAGAATCAAGGGAATGTCA
 TACACGATGTGTTTCAGGAAAGTTTTCAATTGACAAAGAGATGGCAGAAACACAGCATGG
 GACAACAGTGGTGAAAGTCAAGTATGAAGGTGCTGGAGCTCCGTGTAAAGTCCCCATAG
 AGATAAGAGATGTAAACAAGGAAAAAGTGGTTGGGCGCGTTATCTCAGCCACCCCTTTG
 GCTGAGAATACCAACAGTGTAAACCAACATAGAATTAGAACCCCCCTTTGGGGACAGCTA
 CATAGTGATAGGTGTTGGAAACAGCGCACTAACACTCCATTGGTTTCAGGAAAGGGAGTT
 CCATCACCATCACCATCACCTAGGGATCC

F > CHIKV E₂ BamHI (GGATCC) e XbaI (TCTAGA)

GGATCCGCCACCATGGATGCAATGAAGAGAGGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCT
 GTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCAGCCAGGAAATCCATGCCCGATTGAGAAGAGGAG
 CCAGAGTATTAAAGGACCACTTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCGTACCTAGCTCAC
 TGTCCCGACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCGCTAGAACGCATCAG
 AAACGAAGCGACAGACGGGACGTTGAAAATCCAGGTTTCCTTGCAAATCGGAATAAAGA
 CGGATGATAGCCATGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAATCACATGCCAGCAGAC
 GCAGAGCGGGCCGGGCTATTTGTAAGAACGTACGACCCGTGCACGATTACTGGAACAAT
 GGGACACTTCATTCTGGCCCGATGTCCGAAAGGAGAACTCTGACGGTGGGGTTCACTG
 ACGGTAGGAAGATCAGTCACTCATGTACGCACCCATTTACCATGACCCTCCTGTGATA
 GGCCGGGAAAAATTCCATTCCCGACCGCAGCACGGTAGGGAACCTTGCAGCACGTA
 CGCGCAGAGCACCGCTGCAACTGCCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCCAGACACCC
 CAGATCGCACATTAATGTCACAACAGTCCGGCAATGTAAAGATCACAGTCAATAGTCAG

ACGGTGCGGTACAAGTGCAATTGTGGTGACTCAAGTGAAGGATTAACCACTACAGATAA
 AGTGATTAATAACTGCAAGGTCGATCAATGCCATGCCGCGGTACCAATCACAAAAAAT
 GGCAGTATAATTCCCCTCTGGTCCCGCGTAATGCTGAATTCGGGGACCGGAAAGGAAAA
 GTTCACATTCCATTTCTCTGGCAAATGTGACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGAAACCC
 CACCGTGACGTACGGAAAAAACCAAGTCATCATGTTGCTGTATCCTGACCACCCAACGC
 TCCTGTCCTACAGGAATATGGGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGACGCAT
 AAGAAGGAGATCAGGTTAACCGTGCCGACTGAGGGGCTCGAGGTCACGTGGGGTAACAA
 TGAGCCGTACAAGTATTGGCCGCAGTTATCCACAAACGGTACAGCCCACGGCCACCATC
 ACCATCACCATCACTAGTCTAGA

Figura 9 - Clonagem dos genes recombinantes para expressão em células de mamífero. (A) Representação esquemática do cassete de expressão dos genes de interesse acrescidos de modificações para expressão em células eucariontes. (B) Sequência nucleotídica da região codificadora da proteína E do sorotipo 1 de DENV e sequências acessórias identificadas por coloração. (C) Sequência nucleotídica da região codificadora da proteína E do sorotipo 2 de DENV e sequências acessórias identificadas por coloração. (D) Sequência nucleotídica da região codificadora da proteína E do sorotipo 3 de DENV e sequências acessórias identificadas por coloração. (E) Sequência nucleotídica da região codificadora da proteína E do sorotipo 4 de DENV e sequências acessórias identificadas por coloração. (F) Sequência nucleotídica da região codificadora da proteína E₂ de CHIKV e sequências acessórias identificadas por coloração.

5.2 Clonagem do pcDNA 3.1 + Genes de interesse e confirmação de identidade dos plasmídeos por restrição enzimática

Os plasmídeos pcDNA3.1 contendo as sequências que codificam a expressão das proteínas de interesse foram sintetizados pela empresa GenScript. Após o recebimento, bactérias XL1-blue quimiocompetentes foram transformadas e plaqueadas em placa de Petri com LB ágar seletivo (Ampicilina). Dois clones crescidos e espacialmente isolados das demais colônias foram selecionados para cada proteína e utilizados para inóculo. Procedeu-se o inóculo e após 18 horas foi feita mini-prep para purificação dos plasmídeos. Os produtos de mini-prep foram quantificados e armazenados a -20°C.

Para confirmação da identidade dos plasmídeos pcDNA 3.1, as amostras obtidas a partir da purificação por mini-prep dos clones 1 (C1) e 2 (C2) foram submetidas a duas diferentes digestões enzimáticas. A primeira delas (Digestão 1) com as enzimas cujos sítios de restrição foram adicionados para a liberação do inserto e a segunda (Digestão 2) com pares de enzimas que apresentam um sítio de restrição dentro da sequência do gene e outro sítio dentro da sequência do pcDNA3.1(+). Abaixo estão relacionados os respectivos pares de enzima para cada digestão e gene, bem como os tamanhos esperados de fragmentos após as digestões e uma representação esquemática dos plasmídeos (Figura 10). Todos os fragmentos observados após eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão apresentaram peso molecular dentro do padrão esperado (Figura 11).

Proteína E DENV1:

- Digestão 1 (XhoI e BamHI): 5341pb e 1326pb
- Digestão 2 (NheI e HindIII): 5394pb e 1273pb

Proteína E DENV2

- Digestão 1 (XhoI e BamHI): 5341pb e 1374pb
- Digestão 2 (NheI e HindIII): 5937pb e 778pb
-

Proteína E DENV3

- Digestão 2 (NdeI e EcoRV): 6005pb e 656pb
- Digestão 2 (SalI): 3570pb; 2188pb e 903pb

Proteína E DENV4

- Digestão 1 (XhoI e BamHI): 5341pb e 1374pb
- Digestão 2 (XhoI e NdeI): 6298pb e 417pb

Proteína E2 CHIKV

- Digestão 1 (BamHI e XbaI): 5349pb e 1191pb

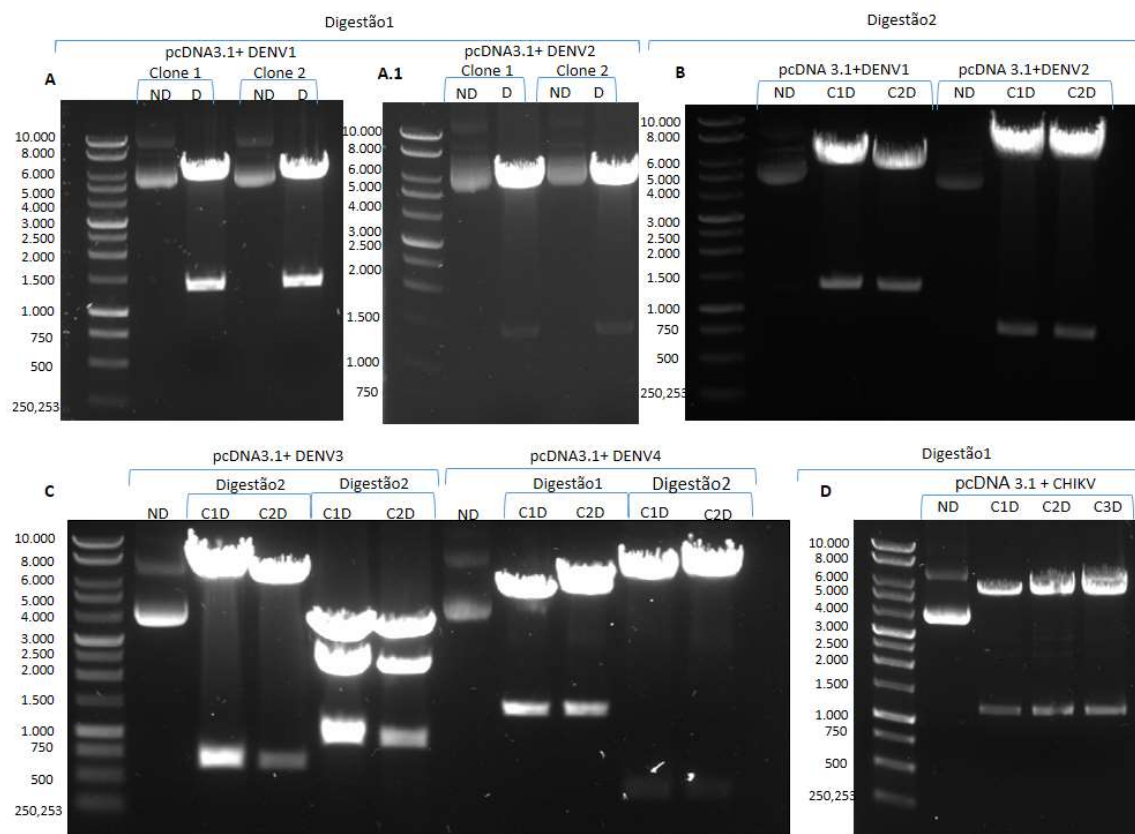


Figura 11 – Análise por eletroforese em gel de agarose após digestão com enzimas de restrição dos plasmídeos pcDNA3.1(+) contendo os genes de interesse. Digestão 1: Enzimas de restrição adicionadas para liberação do inserto. DENV1,2 e 4: *XhoI* e *BamHI*; CHIKV: *BamHI* e *XbaI*. Digestão 2: Enzimas de restrição cujos sítios de clivagem encontram-se dentro da sequência do gene de interesse e dentro da sequência do próprio pcDNA3.1(+). DENV1 e 2: *NheI* e *HindIII*; DENV3: *Sall*, *NdeI* e *EcoRV*; DENV4: *XhoI* e *NdeI*. (C1) Clone1 selecionado após o crescimento em placa de LB ágar seletivo. (C2) Clone2 selecionado após o crescimento em placa de LB ágar seletivo.

5.3 Expressão transiente em células HEK293T da proteína de Envelope dos sorotipos 1 e 2 do vírus da Dengue.

Uma vez confirmada a identidade dos plasmídeos sintetizados, procedeu-se experimentos de transfecção para a expressão dos antígenos. Inicialmente, foi feita a transfecção com os plasmídeos contendo as sequencias codificadoras das proteínas de envelope dos sorotipos 1 e 2 do vírus da Dengue (E DENV1 e E DENV2). A transfecção foi realizada em células HEK293T aderidas utilizando *Lipofectamine*[™] 3000 como veículo de transfecção. Para evitar a interferência das altas concentrações de soro, que suplementam o meio DMEM (10% SFB), a cultura foi mantida em meio *Opti-MEM* (ThermoFisher) por 24h a 48h após a transfecção. Vinte e quatro horas após a transfecção coletou-se uma amostra de sobrenadante (S24h) e 48h horas após a transfecção o restante do sobrenadante foi coletado (S48h) e as células, após o tratamento com tripsina foram centrifugadas para produção de extrato proteico (Ext.) usando tampão de lise específico para células de mamífero *RIPA* (ROCHE).

Para avaliação por Western Blot das mesmas amostras avaliadas em SDS-PAGE (Figura 12) foram utilizados anticorpo primário 4G2 (Anticorpo monoclonal anti-proteína E de flavivírus produzido em camundongo) e anticorpo secundário anti-igG mouse (Sigma). Uma banda de coloração intensa foi observada nos sobrenadantes de todas as células, inclusive as não transfectadas (WT), por isso é possivelmente proveniente do soro fetal bovino. Apesar de não ter sido possível observar uma banda no gel corado em comassie, que sugerisse a expressão das proteínas de interesse, ao avaliar por Western Blot foi possível verificar o reconhecimento pelo anticorpo 4G2 de uma banda de aproximadamente 55kDa, tanto no extrato proteico quanto no sobrenadante das células. Como proteína controle positivo, foi adicionada na análise a proteína de Envelope do sorotipo 2 do vírus da Dengue produzida em *Escherichia coli* fortemente reconhecida pelo anticorpo.

Apesar de detectáveis por Western blot, os níveis de expressão são muito baixos e a proteína é detectada em maior quantidade nos extratos celulares.

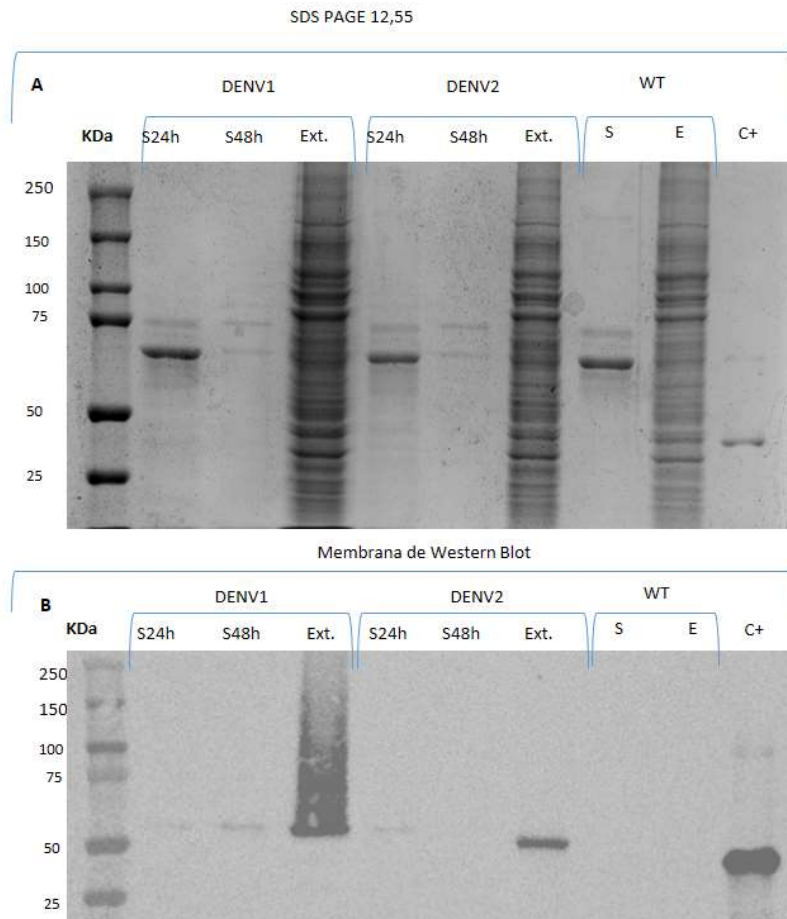


Figura 12 - SDS-PAGE (A) e Western Blot com anticorpo Anti E 4G2(B) do sobrenadante e extrato de células HEK293T transfectadas com pcDNA 3.1 + E DENV1 e pcDNA3.1 + E DENV2. O sobrenadante (24 e 48 horas após a transfecção) e extrato total de células não transfectadas (HEK293T WT) e transfectadas com pcDNA 3.1, mantidas em OptiMEM (ThermoFisher), foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue e transferidas para membrana de nitrocelulose para avaliação em Western Blot. Na primeira canaleta vê-se o marcador de peso molecular; S24h: sobrenadante de células HEK293T coletado 24 horas após a transfecção; S48h: sobrenadante coletado 48 horas após a transfecção; Ext.: extrato total de células; WT: wild type; C+: E DENV2 produzida em procarioto.

5.4 Expressão transiente em células EXPI293 da proteína de Envelope dos sorotipos 1-4 do vírus da Dengue.

As células HEK293T, apesar de se mostrarem capazes de expressar as proteínas recombinantes utilizando o plasmídeo pcDNA3.1, são células que crescem aderidas à superfície da garrafa de cultivo, dificultando o escalonamento dessa produção. Também apresentam como interferente para a avaliação em Western Blot e posterior purificação, a necessidade de suplementação do meio de cultivo (DMEM) com 10% de soro fetal bovino. Alternativamente, a linhagem de células EXPI293, que deriva das células HEK293, mas cresce em suspensão em um meio quimicamente definido e livre de soro, foi escolhida para novas transfecções e posteriores avaliações. Por se tratar de uma linhagem de células humanas, elas são capazes de reproduzir padrões de glicosilação e outras modificações pós-traducionais compatíveis com os observados nas proteínas desses arbovírus ao infectar as células humanas.

Para avaliar se os plasmídeos contêm as sequências necessárias para a expressão proteica, células EXPI293 foram transfectadas com duas diferentes concentrações de plasmídeo pcDNA3.1: 10µg (Transfecção 1) e 25µg (Transfecção 2) utilizando como veículo de transfecção a *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) e o meio *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher). O sobrenadante foi coletado 4 dias após a transfecção. As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE e Western-Blot Anti His tag (figura 13A e B). As células EXPI293 apresentam um padrão de secreção de diversas proteínas no sobrenadante, mesmo com crescimento em meio quimicamente definido (livre de soro fetal bovino e outras proteínas). Apesar de não ter sido possível observar uma banda distinta no gel SDS-PAGE que sugira a expressão proteica, em ensaio de Western Blot com anticorpo produzido em camundongo *Anti-6x His Tag* (Sigma) é possível identificar a expressão da proteína E de DENV1 e DENV2 na primeira transfecção e das proteínas de Envelope dos 4 sorotipos na segunda transfecção. (Figura 13B).

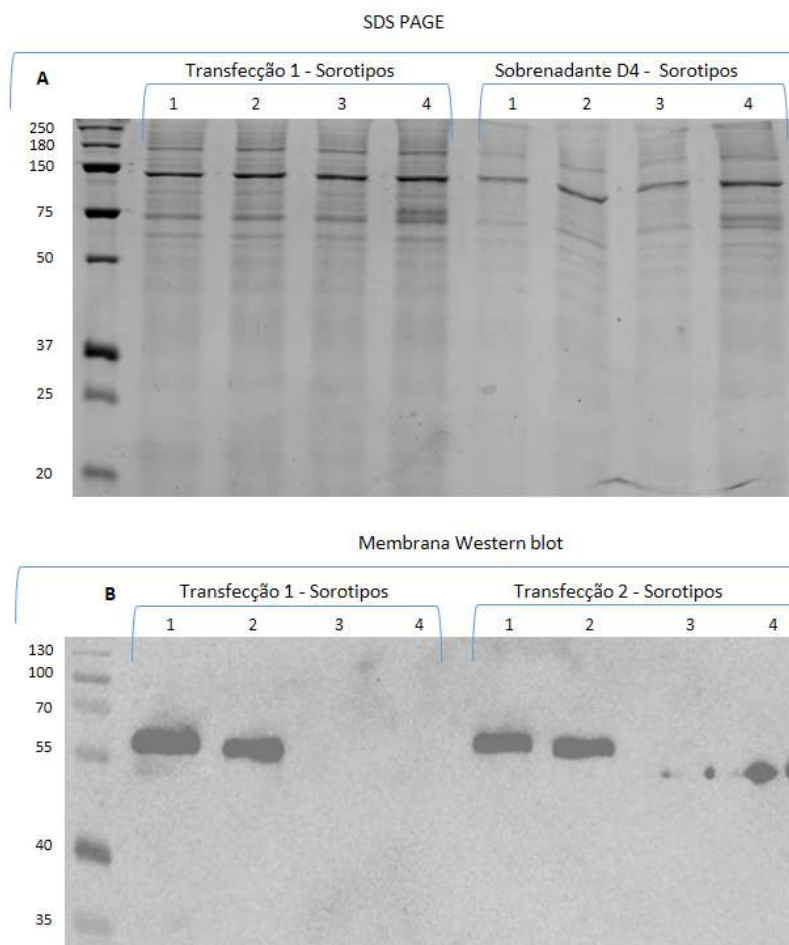


Figura 13 - SDS-PAGE (A) e Western Blot com anticorpo Anti His tag (B) do sobrenadante de células EXPI293 coletados 4 dias após a transfecção com diferentes concentrações do pcDNA 3.1 + Genes de interesse. Os sobrenadantes de células EXPI293 transfectadas com pcDNA 3.1 contendo o cassette para expressão das proteínas dos 4 sorotipos do vírus da Dengue foram coletados e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue e transferidas para membrana de nitrocelulose para avaliação em Western Blot. Na primeira canaleta vê-se o marcador de peso molecular; 1-4 correspondem aos 4 sorotipos do vírus da Dengue avaliados em duas diferentes transfecções em que variou-se a concentração de DNA (pcDNA3.1). Transfecção 1: realizada com 10µg de DNA e Transfecção 2: realizada com 25 µg de DNA.

5.5 Clonagem do pcDNA 3.1 + Genes de interesse após otimização de códons e confirmação de identidade dos plasmídeos por restrição enzimática

Inicialmente, optou-se por utilizar as sequências que codificam a expressão dos genes de interesse da forma nativa, sem códon otimização, entretanto, os baixos níveis de expressão das proteínas poderiam ser atribuídos a ausência dessa otimização para a tradução do RNA em células de mamífero. Foi solicitada, então uma nova síntese de plasmídeos pcDNA 3.1 contendo sequências códon otimizadas.

Após o recebimento desses plasmídeos, repetiu-se o protocolo de transformação e seleção de clones, conforme descrito no item 4.2.1 da metodologia. Para confirmação da identidade dos plasmídeos pcDNA 3.1, as amostras obtidas a partir da purificação por mini-prep dos clones 1 e 2 foram submetidas a duas diferentes digestões (Figura 14). A primeira delas, com enzimas (XhoI e BamHI) cujos sítios de restrição encontram muito próximos ou foram inseridos para liberação do inserto e a segunda com uma enzima (PstI), que apresenta um sítio de restrição dentro da sequência dos genes e outro sítio dentro da sequência do pcDNA3.1(+). Abaixo estão relacionadas as respectivas enzimas utilizadas em cada digestão e gene, bem como os tamanhos esperados de fragmentos após as digestões. Todos os fragmentos observados após eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão apresentaram peso molecular dentro do padrão esperado, exceto pelo Clone 2 de DENV3.

BamI e XhoI:

- DENV1: 5341pb e 1326pb
- DENV2: 5341pb e 1374pb
- DENV3: 5341pb e 1320pb
- DENV4: 5341pb e 1374pb

PstI:

- DENV1: 4684pb e 1983pb
- DENV2: 5054pb e 1661pb
- DENV3: 4265pb e 2396pb
- DENV4: 4453pb e 2262pb

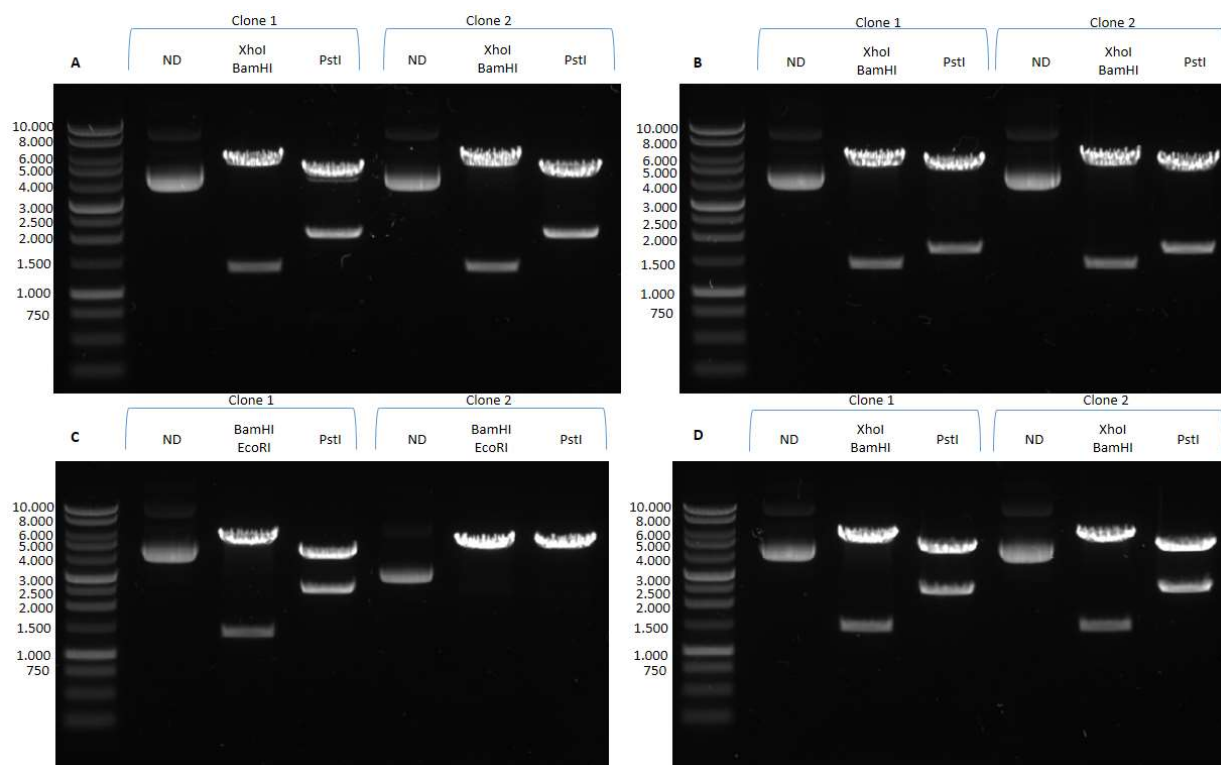


Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose após digestão com enzimas de restrição para confirmação de identidade dos plasmídeos pcDNA3.1(+) clonados com os genes de interesse após códon otimização. (A) pcDNA3.1 + DENV1. (B) pcDNA3.1 + DENV2. (C) pcDNA3.1 + DENV3. (D) pcDNA3.1 + DENV4. Ezimas XhoI e BamHI: apresentam sítios de restrição muito próximos ou que foram inseridos para liberação do inserto. Enzima PstI apresenta um sítio de restrição dentro da sequência do gene e outro sítio dentro da sequência do pcDNA3.1(+). Clone 1 selecionado após o crescimento em placa de LB ágar seletivo. Clone 2 selecionado após o crescimento em placa de LB ágar seletivo.

5.6 Expressão transiente em células EXPI293 da proteína de Envelope dos sorotipos 1-4 do vírus da Dengue utilizando pcDNA3.1 após otimização de códons das sequências gênicas.

Para avaliar possíveis melhorias provocadas pela otimização de códons na expressão em células de mamífero, células EXPI293 foram transfectadas utilizando 25µg de DNA e *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) como veículo de transfecção em meio *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher). O sobrenadante (S) foi coletado 4 dias após a transfecção e centrifugação das células. 1mL de cultivo foi utilizado para produção de extrato proteico (E) usando tampão de lise específico para células de mamífero. O restante das células que foram centrifugadas foram ressuspensas em 50mL de meio novo acrescido de 400µg/mL de G418. As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE e Western-Blot Anti his tag (figura 15A e B). Não foi possível observar uma banda distinta no gel SDS-PAGE que sugira a expressão proteica, entretanto ao avaliar por Western Blot com anticorpo produzido em camundongo *Anti-6x His Tag* (Sigma) nota-se a marcação das proteínas de DENV2, DENV3 e DENV4 no sobrenadante das células, e da proteína controle (Proteína de Envelope do sorotipo 2 do vírus da Dengue produzida em *Escherichia coli*).

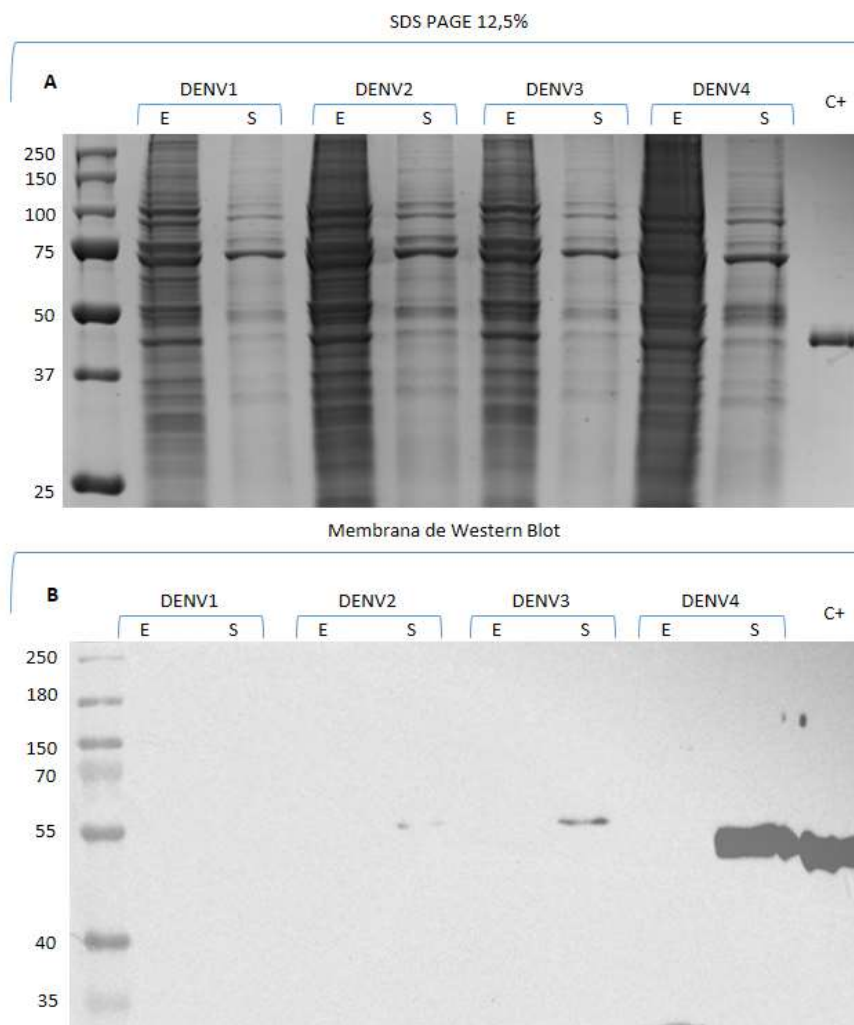


Figura 15 - SDS-PAGE (A) e Western Blot com anticorpo Anti His tag (B) do sobrenadante e extrato de células EXPI293 transfectadas com pcDNA 3.1 + E DENV1-4. O sobrenadante e extrato de células EXPI293 transfectadas com pcDNA 3.1, contendo o cassete códon otimizado para expressão das proteínas dos 4 sorotipos do vírus da Dengue foram coletados e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose para avaliação em Western Blot. Na primeira canaleta vê-se o marcador de peso molecular. (E) extrato total de células transfectadas. (S) sobrenadante coletado 4 dias após a transfecção. C+: E DENV2 produzida em procarioto.

Após a confirmação da expressão das proteínas de DENV2, DENV3 e DENV4 no sobrenadante das células, o sobrenadante correspondente ao sorotipo 4, que pareceu demonstrar melhores níveis de expressão, foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de níquel utilizando a coluna HisTrap™ *High Performance* (Cytiva™) em aparelho ÄKTA Pure™ *Protein Purification System* (Cytiva™).

O sobrenadante de EXPI293 transfectada com pcDNA3.1+ E DENV4 foi submetido a purificação e as frações foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 16A). Cada fração obtida após a eluição foi composta por 1,8mL de eluato e nas frações 2-7 é possível observar uma banda única, de cerca de 55kDa correspondente ao tamanho esperado da proteína glicosilada. As frações 3-5 pareciam apresentar maior concentração e foram, portanto, selecionadas para compor o pool (Figura 16B).

Para determinar a concentração aproximada da proteína E DENV4 no pool das frações 3-5, 3mL de amostra do pool foram submetidos a centrifugação em colunas Amicon de 10kDa para concentração em 10x. Amostras de 30 µl concentrada (C) e não concentrada (NC) foram submetidas a SDS-PAGE (Figura 8C) em comparação com um padrão de BSA. A presença do imidazol e a baixa concentração proteica impediram a quantificação da amostra pelos kits 2-D Quant (Cytiva), BCA *Protein Assay* (ThermoFisher) e utilizando o reagente de *Bradford* (BioRad).

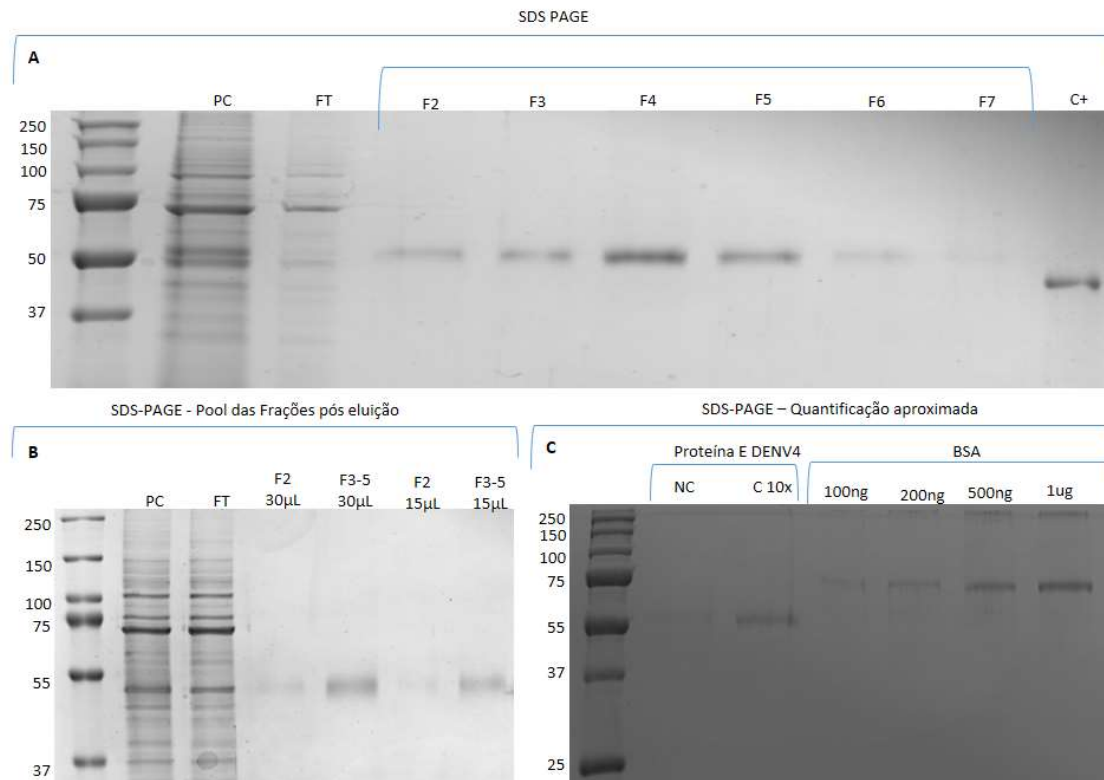


Figura 16 - Purificação do sobrenadante de células EXPI293 transfectadas com pcDNA 3.1 + E DENV4 códon otimizada. (A) SDS-PAGE das frações eluídas após a purificação PC: Amostra pré coluna – Sobrenadante de EXPI293 coletado 4 dias após a transfecção com pcDNA 3.1 + E DENV4 códon otimizada. FT: Flow through - Fração que não se ligou à coluna de afinidade. F2-F7: Frações eluídas da coluna utilizando tampão com 500mM de imidazol. C+: E DENV2 produzida em procarioto. **(B)** SDS PAGE para avaliação da Fração 2 (F2) e do pool das frações 3-5 de proteína (F3-5) gerado após a purificação utilizando 2 diferentes volumes 30 e 15μL de amostra. **(C)** Eletroforese em gel 12,5% comparando o pool das frações 3-5 (NC) não concentrado e (C10x) concentrado 10x com um padrão de BSA.

5.7 Expressão estável sob pressão seletiva da proteína de Envelope dos sorotipos 1-4 do vírus da Dengue em células EXPI293 utilizando pcDNA3.1 após otimização de códons das sequências gênicas.

Após o cultivo das células, em meio contendo 400ng/mL de G418 apenas a cultura correspondente à transfecção com pcDNA 3.1+E DENV4 sobreviveu, as culturas de DENV1, DENV2 e DENV3 perderam gradualmente viabilidade até se extinguirem completamente. Uma cultura não transfectada foi mantida em paralelo e também não se mostrou resistente a essa concentração de G418.

A cultura de EXPI293 transfectada com o pcDNA3.1 + E DENV4 passou a ser mantida em repiques com 3×10^5 células por mL 3x por semana durante 32 passagens na presença de G418. Ao final desse período a cultura foi centrifugada para produção de extrato total de proteínas (E) utilizando tampão de lise específico para células de mamífero e o sobrenadante (S) foi coletado e purificado para determinar se na presença de pressão seletiva as células continuavam a expressar a proteína de interesse. Células EXPI293 Wild Type (WT) foram utilizadas como controle negativo.

Após a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Figura 17A) foi possível observar uma banda nas frações 4-6 pós eluição de aproximadamente 55kDa. As amostras de (E) extrato e (S) sobrenadante pré purificação e pool das frações 4-6 pós purificação foram analisados em SDS PAGE (Figura 17B) e Western Blot anti his tag (Figura 17C). Os resultados demonstraram a possibilidade de purificação da proteína a partir do sobrenadante das células transfectadas e submetidas a seleção com 400ng/mL G418. Esse resultado demonstra também que a proteína é expressa de forma contínua mesmo após 30 subcultivos.

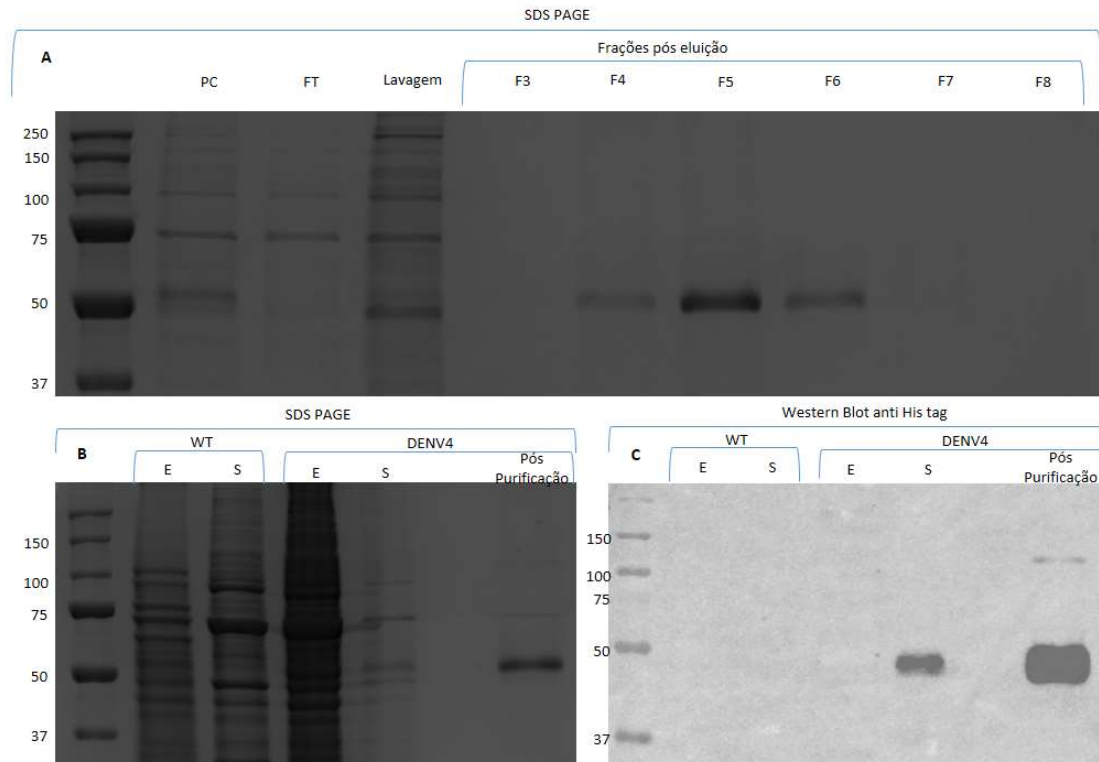


Figura 17 - Purificação de proteínas do sobrenadante de células EXPI293 transfectadas com pcDNA 3.1 + E DENV4 códon otimizada 30 passagens após a transfecção na presença de pressão seletiva com G418. (A) SDS-PAGE das frações eluídas após a purificação PC: Amostra pré coluna – Sobrenadante de EXPI293 coletado 32 passagens após a transfecção com pcDNA 3.1 + E DEN1V4 códon otimizada. FT: Flow through - Fração que não se ligou à coluna de afinidade. F3-F7: Frações eluídas da coluna utilizando tampão com 500mM de imidazol. (B) SDS PAGE para avaliação de (E) extrato e (S) sobrenadante pré purificação e pool das frações 4-6 pós purificação (Pós purificação) (C) Western Blot anti his tag das amostras avaliadas em SDS-PAGE. WT) células EXPI293 não transfectadas

5.8 Estratégia alternativa para obtenção de linhagens estavelmente transduzidas com vetor viral e confirmação de identidade dos plasmídeos para montagem do lentivírus.

Apesar dos dados promissores para um dos sorotipos de DENV utilizando o sistema de expressão baseado no pcDNA 3.1, os altos custos da expressão transiente, a falta de precisão e reprodutibilidade da expressão estável sob pressão seletiva e as baixas concentrações de proteína obtidas como produto final, fizeram com que novas alternativas fossem buscadas para modificação genética das células de mamífero e geração de linhagens que expressem os antígenos de forma estável. A nova plataforma selecionada baseia-se na transdução das células alvo por vetor viral (lentivírus). Uma vez que esse vetor é capaz de se integrar no genoma da célula hospedeira com maior eficiência do que o plasmídeo pcDNA 3.1, espera-se um melhor resultado da expressão estável dos antígenos.

Para montagem do vetor viral, conforme descrito no tópico 4.6.3 da metodologia, é necessária uma combinação de 3 plasmídeos, estes foram gentilmente cedidos pela Dra. Caroline Junqueira e após o recebimento foram amplificados em bactérias XL1-Blue, purificados por miniprep e tiveram sua identidade confirmada por meio de digestão enzimática (Figura 18). O plasmídeo de transferência pLVX puro, foi digerido com as enzimas BamHI e NdeI e os fragmentos esperados eram de 7614 e 488pb. O plasmídeo de packing pspAX₂ foi digerido com a enzima NcoI, que possui dois sítios de restrição na sequência do plasmídeo, os fragmentos esperados eram de 8092 e 2617pb. O plasmídeo contendo a proteína de envelope para ligação e transdução da célula alvo pCMV.VSV.G foi digerido com as enzimas XbaI e XhoI e os fragmentos esperados eram de 3405, 1680 e 1422pb.

5.9 Avaliação da estratégia de transdução com vetor viral (Lentivírus) utilizando a proteína fluorescente vermelha (RFP).

Com o objetivo de demonstrar a efetividade do sistema para provocar modificação gênica em células de mamífero, experimentos iniciais foram realizados com a proteína fluorescente vermelha (RFP). Para isso foi necessário clonar o gene que codifica a expressão dessa proteína no plasmídeo de

transferência pLVXpuro. O plasmídeo pcDNA3.1 contendo a sequência que codifica a expressão da RFP foi digerido com as enzimas XbaI e XhoI para liberação do inserto contendo 679pb e o plasmídeo pLVX puro foi digerido com as mesmas enzimas, presentes no sítio múltiplo de clonagem, gerando extremidades coesivas para posterior ligação. Após a eletroforese, as bandas correspondentes ao inserto (gene da RFP) e ao vetor (pLVX puro digerido com XbaI e XhoI) foram purificadas e incubadas na presença de DNA ligase para construção do novo plasmídeo pLVX + RFP.

Após a ligação, bactérias DH5 α quimeocompetentes foram transformadas com o novo plasmídeo e plaqueadas e em placa de Petri com LB ágar seletivo (Ampicilina). Dois clones crescidos e espacialmente isolados das demais colônias foram selecionados e utilizados para inóculo. Procedeu-se o inóculo e após 18 horas foi feita mini-prep para purificação dos plasmídeos. Os produtos de mini-prep foram quantificados e armazenados a -20°C.

Para confirmação da identidade dos novos plasmídeos pLVX+RFP purificados, procedeu-se digestão enzimática (Figura 19) com a enzima NcoI, gerando fragmentos de 6.100pb; 1.800pb; 739pb. O plasmídeo pcDNA 3.1 + RFP, que seria utilizado como controle nas transfecções foi novamente avaliado por digestão com enzima NcoI gerando os fragmentos esperados de 3.300pb; 1.200pb; 785pb; 735pb.

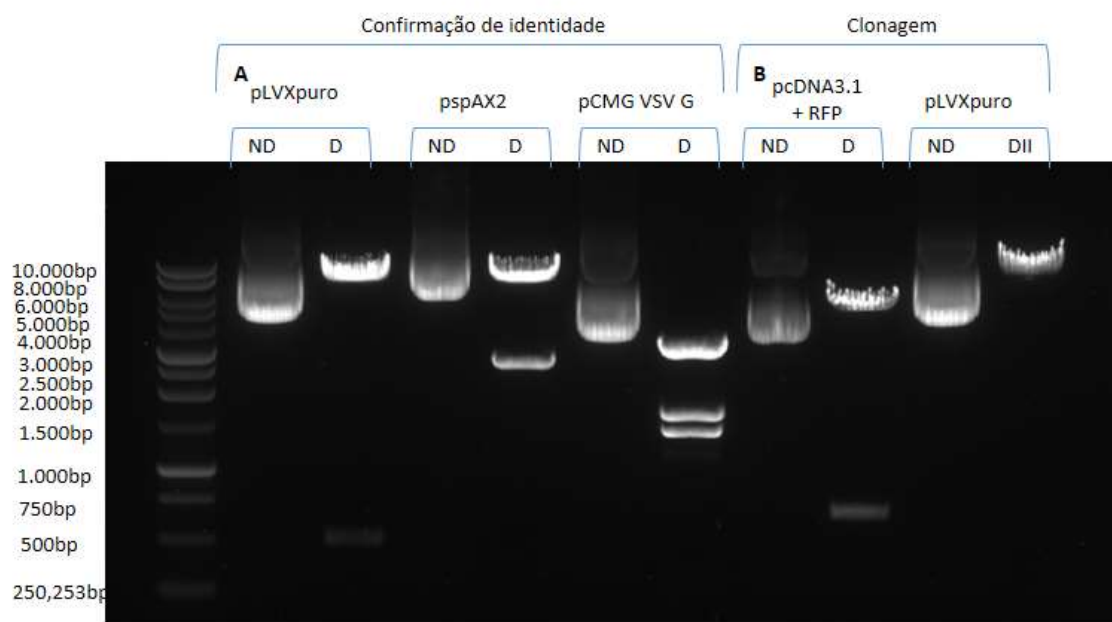


Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose após digestão com enzimas de restrição para confirmação de identidade dos plasmídeos para montagem do vetor viral e clonagem do plasmídeo pLVX+RFP. ND: Não digerido D: Digerido. (A) Confirmação de identidade dos plasmídeos para montagem do vetor viral (Lentivírus). pLVX puro digerido com as enzimas BamHI e NdeI levando a produção dos fragmentos esperados de 7614 e 488pb. pspAX₂ digerido com a enzimas NcoI levando a produção dos fragmentos esperados de 8092 e 2617pb. pCMV.VSV.G digerido com as enzimas XbaI e XhoI levando a produção dos fragmentos esperados de 3405, 1680 e 1422pb. (B) Digestão enzimática com as enzimas XbaI e XhoI para clonagem do gene da RFP no plasmídeo de transferência pLVXpuro. pcDNA 3.1+ RFP liberando fragmentos esperados de 5400pb e 679pb e pLVXpuro liberando fragmentos esperados de 8043pb e 59pb.

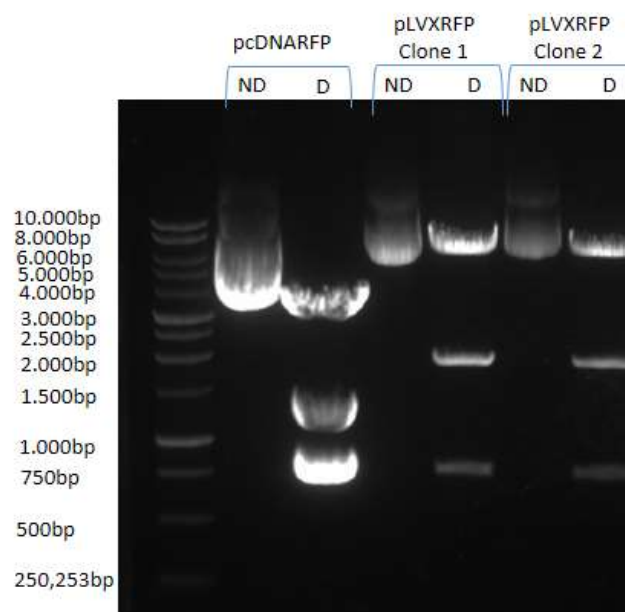


Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose após digestão com enzimas de restrição para confirmação de identidade do novo plasmídeo pLVX+RFP gerado após clonagem. ND: Não digerido D: Digerido. Plasmídeo pcDNA 3.1 + RFP, controle positivo das transfecções, digerido com enzima *NcoI* gerando os fragmentos esperados de 3.3pb; 1.200pb; 785pb; 735pb. Plasmídeo pLVX+RFP purificados a partir dos Clones 1 e 2 digeridos com a enzima *NcoI*, gerando fragmentos esperados de 6.100pb; 1.800pb; 739pb.

Após a confirmação da identidade do plasmídeo pLVX+RFP, células HEK293T aderidas foram co-transfectadas utilizando *Lipofectamine® 3000* como veículo de transfecção e uma proporção de 1:1:1 dos plasmídeos para montagem do vetor viral pCMV.VSV,G; pspAX₂ e pLVX+RFP, respectivamente, totalizando 7,5µg de DNA. Para evitar a interferência das altas concentrações de soro, que suplementam o meio DMEM (10% SFB), e que poderiam interferir no processo de adsorção do vírus nas células alvo, a concentração final de soro fetal bovino no meio DMEM após a transfecção foi reduzida para 2,5%. 18h após a transfecção o sobrenadante foi coletado, filtrado em filtro 0,22µm e utilizado para transduzir uma nova cultura de HEK293T. As imagens das células 18h após a transdução com vetor viral estão apresentadas na figura 20 (A) em microscopia de fluorescência utilizando filtro para RFP, (B) microscopia de campo claro. Experimento de citometria apresentado na figura 20C e D, também utilizando filtro para RFP demonstrou que 99,2% das células presentes na cultura transduzida eram capazes de expressar a proteína de interesse (Figura 20D),

células WT foram utilizadas como controle negativo e para desenho do Gate (Figura 20C).

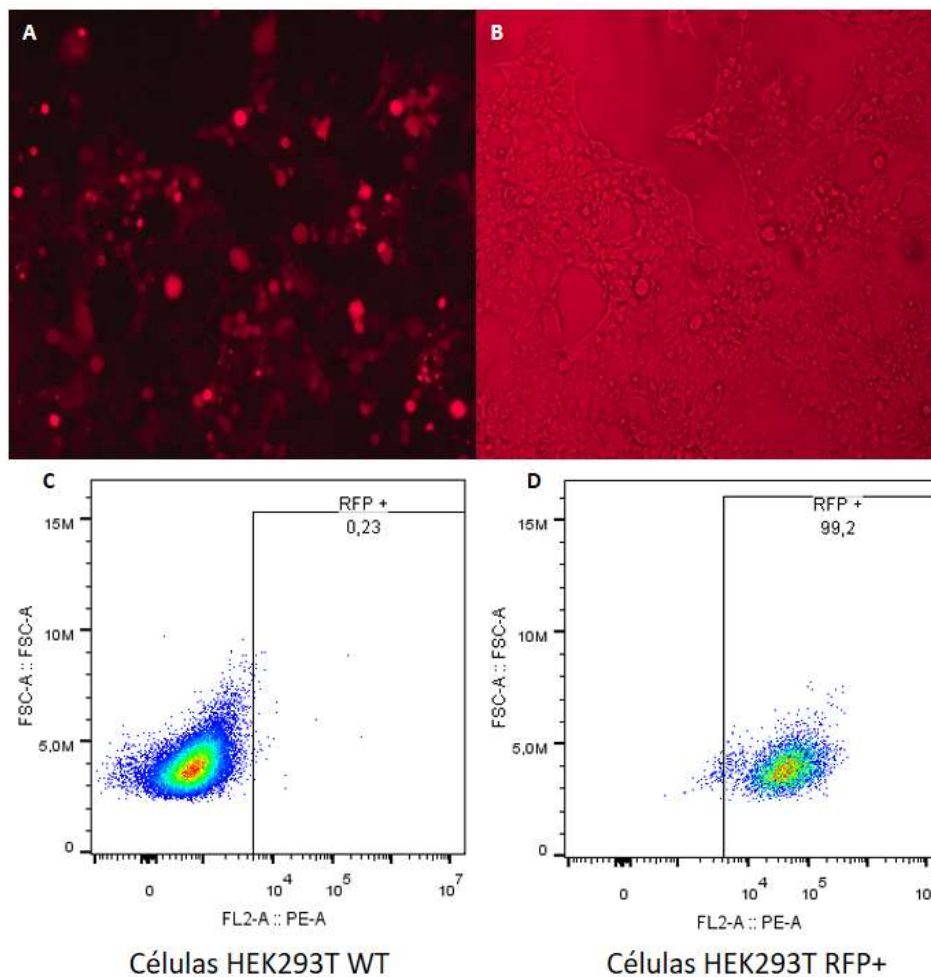


Figura 20 – Avaliação da funcionalidade da estratégia que utiliza vetor lentiviral para modificação gênica de células utilizando a proteína fluorescente vermelha (RFP). Células HEK293T 18h após a transdução com vetor viral em (A) microscopia de fluorescência utilizando filtro para RFP, (B) microscopia de campo claro. (C e D) Análise por citometria de fluxo utilizando filtro para RFP. (C) Células WT foram utilizadas como controle negativo.

5.10 Clonagem dos plasmídeos pLVX puro para transferência do gene da proteína de envelope dos 4 sorotipos do vírus da Dengue.

Uma vez demonstrada a funcionalidade dos vetores lentivirais para indução da expressão proteica em células de mamífero, procedeu-se a clonagem das sequências da proteína de Envelope dos 4 sorotipos do vírus da dengue no plasmídeo de transferência pLVX puro. Apesar da avaliação inicial em HEK293T, as células escolhidas para a continuidade desse trabalho foram as células EXPI293, que demandaram algumas modificações no protocolo de transfecção para montagem do vetor viral e transdução das células alvo. A sequência não foi códon otimizada foi utilizada, uma vez que, em experimentos de expressão transiente, células EXPI293 com as sequências códon otimizadas não foram capazes de expressar inicialmente as proteínas dos 4 sorotipos.

Para clonagem dos genes de DENV no pLVX os plasmídeos pcDNA3.1 contendo as sequências da proteína de envelope de DENV1-4 foram digeridos com as enzimas XhoI e BamHI para DENV1, 2 e 4 e EcoRI e BamHI para DENV3 para liberação do inserto. O plasmídeo pLVX puro foi digerido com as mesmas enzimas, presentes no sítio múltiplo de clonagem, gerando extremidades coesivas para posterior ligação. Após a eletroforese, as bandas correspondentes aos insertos e ao vetor (pLVX puro digerido com as respectivas enzimas) foram purificadas e incubadas na presença de DNA ligase para construção dos novos plasmídeos.

Após a ligação, bactérias DH5 α quimeocompetentes foram transformadas com esses novos plasmídeos e plaqueadas e em placa de Petri com LB ágar seletivo (Ampicilina). Dois clones crescidos e espacialmente isolados das demais colônias foram selecionados para cada proteína e utilizados para inóculo. Procedeu-se o inóculo e após 18 horas foi feita mini-prep para purificação dos plasmídeos. Os produtos de mini-prep foram quantificados e armazenados a -20°C.

Para confirmação da identidade dos novos plasmídeos pLVX+ E DENV1-4 purificados, procedeu-se digestão enzimática (Figura 21) com as enzimas XhoI e BamHI para DENV1, 2 e 4 e EcoRI e BamHI para DENV3 e em eletroforese em gel de agarose foi possível observar os fragmentos esperados,

de 1326 e 8102 bp para DENV1; 1374 e 8102 bp para DENV2; 1320 e 8071pb para DENV3 e 1380 e 8102pb para DENV4.

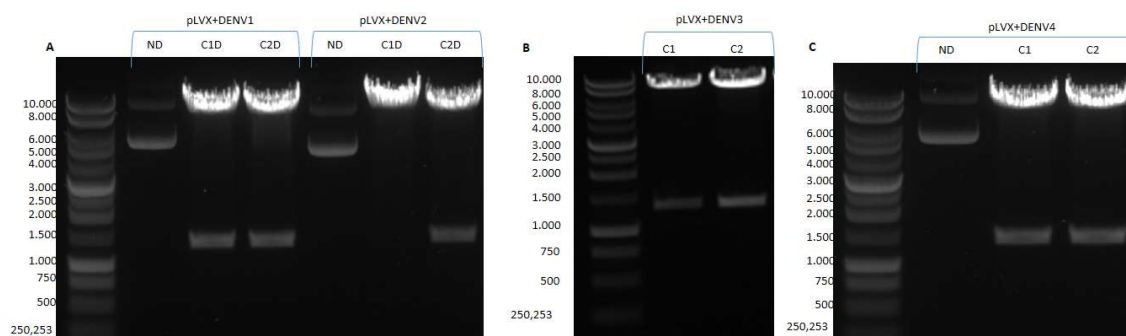


Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose após digestão com enzimas de restrição para confirmação de identidade dos plasmídeos pLVX + E DENV1-4 gerados após clonagem. ND: Não digerido. **D:** Digerido. **C1:** Clone 1 selecionado após o crescimento em placa de LB ágar seletivo. **C2:** Clone 2 selecionado após o crescimento em placa de LB ágar seletivo. Digestão enzimática com as enzimas XhoI e BamHI para DENV1, 2 e 4 e EcoRI e BamHI para DENV3. Fragmentos esperados, de 1326 e 8102 bp para DENV1; 1374 e 8102 bp para DENV2; 1320 e 8071pb para DENV3 e 1380 e 8102pb para DENV4.

5.11 Transfecção com plasmídeos contendo sequencias codificadoras da proteína de envelope dos sorotipos 1 a 4 do vírus da Dengue em células HEK293T para geração do vetor lentiviral.

Uma vez confirmada a identidade dos plasmídeos de transferência, células HEK293T aderidas foram co-transfectadas com os plasmídeos para montagem do vetor viral pCMV.VSV,G; psAX₂ e pLVX+RFP, utilizando *Lipofectamine*[™] 3000 como veículo de transfecção. 24h após a transfecção, foram utilizados 2 mL de sobrenadante lentiviral para transduzir 5x10⁶ células HE293T WT. Após a recuperação, as culturas foram selecionadas com 2 µg/ml de puomicina, antibiótico cujo gene de resistência está presente no plasmídeo de transferência.

5.12 Análise da integração dos genes da proteína E de DENV1, 2 e 4 após a transdução com vetor lentiviral

Para confirmar a integração dos genes, após a recuperação das culturas 4x10⁶ células HEK293T para cada sorotipo foram submetidas a extração de DNA

utilizando o kit *QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen)*. As amostras dos sorotipos 1, 2 e 4 foram amplificadas por PCR utilizando o par de primers específicos para a sequência dos genes. Até a realização desse experimento a cultura do sorotipo 3 ainda não havia se recuperado. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Figura 22) e apresentaram tamanhos esperados de 1182pb para DENV1; 1141pb para DENV2 e 1173pb para DENV4 e (C+) Controle positivo: plasmídeo pcDNA3.1 + E DENV4.

A amplificação dos fragmentos esperados demonstra a integração dos genes da proteína E no genoma de células HEK293T após a transdução com vetor lentiviral.

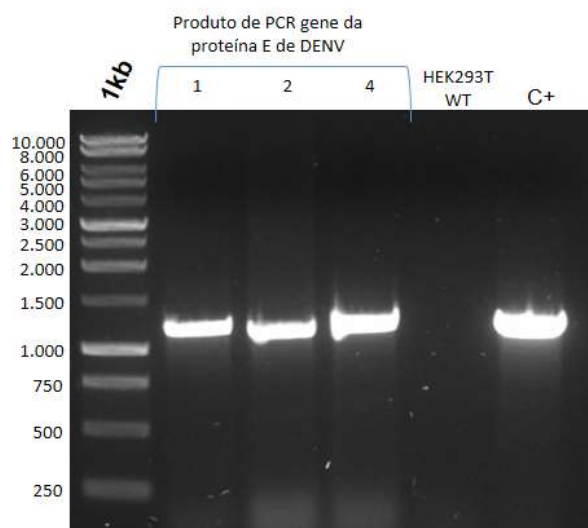


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR gerados a partir do DNA de células HEK293T transduzidas com lentivírus para a expressão da proteína de envelope dos sorotipos 1, 2 e 4 de DENV. Amplificação de parte da sequência do gene de interesse em amostras de DNA genômico das células HEK293T. DNA genômico purificado pelo kit *QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen)* e amplificado por pares de primers específicos. Os produtos de PCR apresentaram tamanho esperado de 1182pb para DENV1; 1141pb para DENV2 e 1173pb para DENV4 e (C+) Controle positivo: plasmídeo pcDNA3.1 + E DENV4.

5.13 Avaliação da expressão das proteínas de interesse em células HEK293T após a transdução com vetor lentiviral

Após a transdução com vetor viral, as culturas de células HEK293T foram submetidas a troca de meio, de DMEM + 2,5%SFB para *Opti-MEM*

(ThermoFisher) uma vez que composição deste meio requer menor suplementação de soro, permitindo uma melhor avaliação nos ensaios posteriores. As amostras de sobrenadante foram purificadas utilizando beads de agarose com níquel para que fosse possível observar a expressão em ensaios de Western blot anti com anticorpo produzido em camundongo *Anti-6x His Tag* (Sigma).

Em ensaio de Western blot com anticorpo anti his tag (Figura 23) foi possível observar a expressão das 4 proteínas, ainda que em baixas concentrações, no sobrenadante de células HEK293T transduzidas.

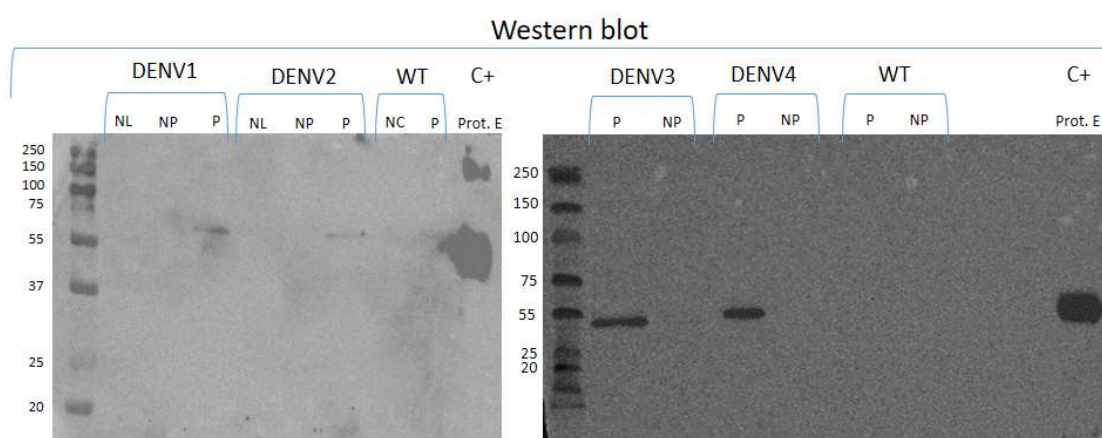


Figura 23 - Western Blot com anticorpo Anti His tag do sobrenadante purificado de células EXPI293 transduzidas por vetor viral para a expressão da proteína E de DENV1-4. NL: Amostra que não se ligou às beads de agarose **NP:** sobrenadante antes da purificação. **P:** sobrenadante purificado. **C+:** E DENV2 produzida em procarioto.

5.14 Avaliação da estabilidade dos genes na ausência de pressão seletiva.

Após a transdução e recuperação, para avaliar a estabilidade da modificação genica, células HEK293T transduzidas e que expressavam proteína de envelope dos sorotipos 1 e 2 do vírus da Dengue foram mantidas em duas condições: Sem antibiótico de seleção (Puromicina) e com 20µg/mL de Puromicina (10x mais do que o necessário para seleção) por 15 passagens. Foi então realizada nova extração de DNA utilizando o kit *QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen)*. As amostras dos sorotipos 1, 2 foram amplificadas por PCR utilizando o par de primers específicos para a sequência dos genes. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Figura 24) e apresentaram tamanhos esperados de 1182pb para DENV1; 1141pb para DENV2, sugerindo a estabilidade do gene integrado às culturas.



Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR gerados a partir do DNA de células HEK293T transduzidas com lentivírus para a expressão da proteína de envelope dos sorotipos 1 e 2 mantidas com e sem pressão seletiva durante 15 passagens. Amplificação de parte da sequência do gene de interesse em amostras de DNA das células HEK293T transduzidas. O DNA genômico foi purificado e amplificado por pares de primers específicos. S.Puro: Produto de PCR do DNA genômico de células HEK293T transduzidas por vetor viral e posteriormente mantidas na ausência de antibiótico de seleção. 20µg: Produto de PCR do DNA genômico de células HEK293T transduzidas por vetor viral e posteriormente mantidas na presença de 20µg/mL de antibiótico de seleção.

5.15 Expressão estável da proteína de envelope dos 4 sorotipos do vírus da Dengue em células EXPI 293 por meio de transdução com vetor lentiviral.

Apesar de demonstrarem capacidade de expressão das proteínas de interesse também por meio de transdução com vetor lentiviral, as células HEK293T apresentam baixos níveis de expressão. Outras desvantagens já descritas anteriormente, como a dificuldade de escalonamento e a interferência do soro fetal bovino, presente no meio, favoreceram utilização da linhagem de células EXPI293, que crescem em suspensão em meio quimicamente definido e livre de SFB.

Para montagem da partícula viral, 5×10^6 células EXPI foram co-transfectadas com os plasmídeos pCMV.VSV.G, pspAX₂ e pLVX + E de DENV1-4 numa proporção de 2:2:1, totalizando 25µg de DNA plasmidial utilizando *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) como veículo de transfecção e o meio *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher). 24h após a transfecção foram adicionados os *Enhancers* que compõem o kit da *ExpiFectamine™*, 48 e 72h após a transfecção as células foram centrifugadas e os sobrenadantes contendo partículas virais foram coletados. Estes, foram concentrados de 25 para 4mL em filtro Amicon de 10kDa e 2 mL utilizados para transdução de novas culturas de células EXPI293 WT.

Visando aumentar os níveis de expressão, as culturas foram transduzidas novamente com sobrenadantes contendo partículas virais. Os sobrenadantes das células coletados após a primeira e segunda transdução para os 4 sorotipos foram avaliados por SDS-PAGE e Western Blot anti DENV e/ou anti His tag conforme apresentado nas figuras 25 e 26. Uma banda inesperada foi observada do ensaio de western blot na amostra não transduzida (Figura 26 - WT), essa banda pode se tratar de um interferente do reagente de revelação ou uma ligação inespecífica. Entretanto nesses ensaios foi possível detectar a expressão das proteínas de interesse para os 4 sorotipos

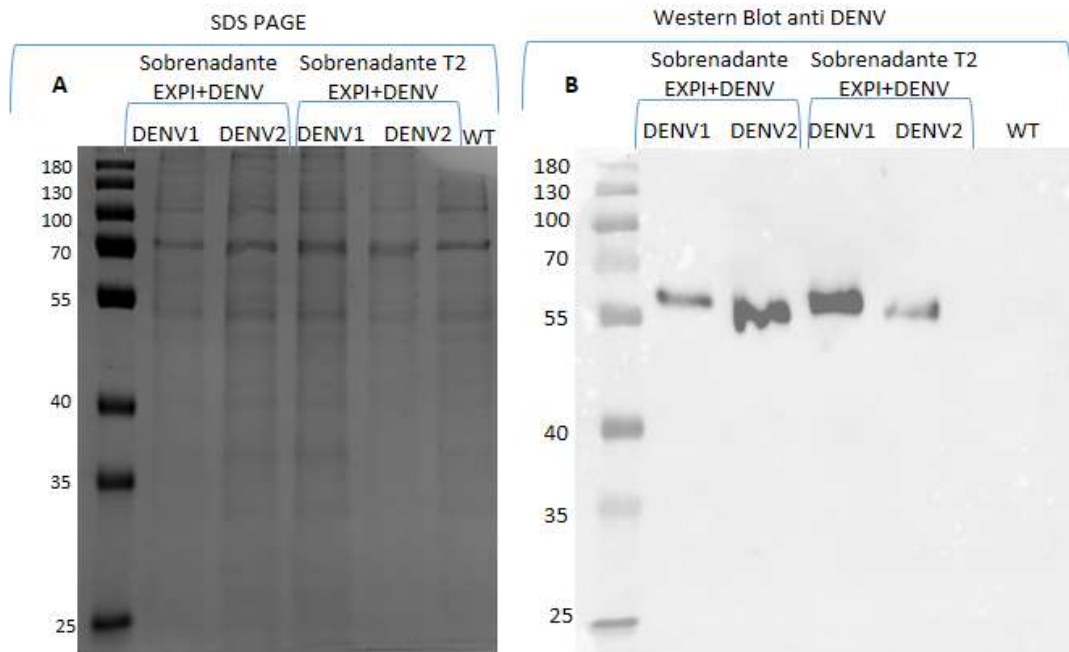


Figura 25 - SDS-PAGE (A) e Western Blot Anti DENV (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas e retransduzidas por vetor viral. O sobrenadante de células EXPI293 transduzidas e retransduzidas (T2) com vetores virais que induziram integração do gene para expressão das proteínas dos sorotipos 1 e 2 do vírus da Dengue foram coletados e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, em seguida, transferidos para membrana de nitrocelulose para avaliação no ensaio de Western Blot. (WT) células EXPI293 não transduzidas.

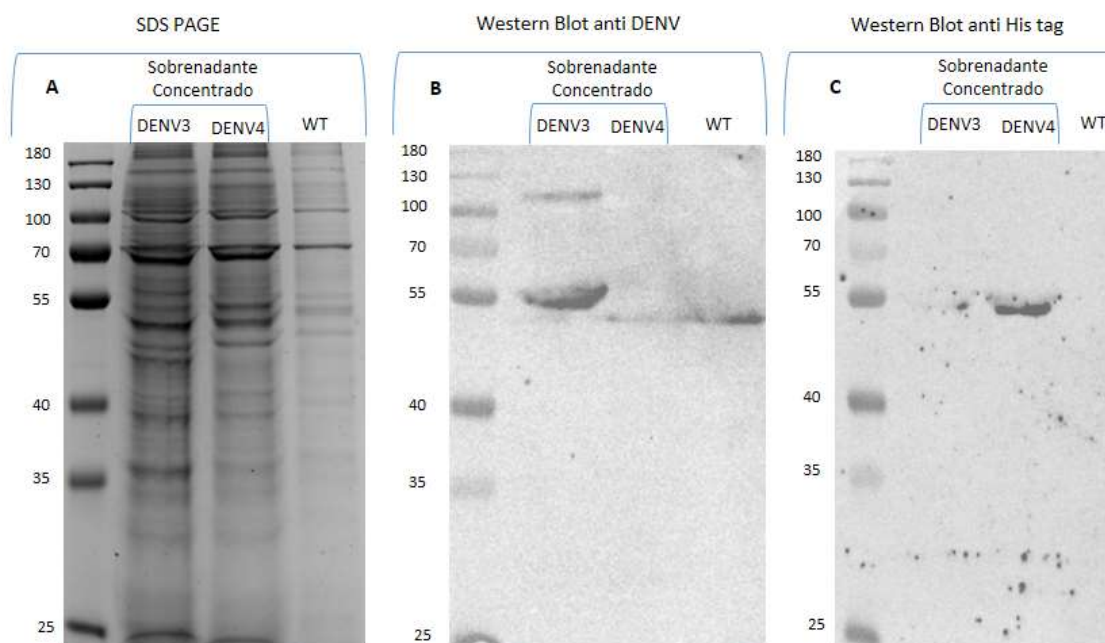


Figura 26 - SDS-PAGE (A) Western Blot Anti DENV (B) e Western Blot Anti his tag (C) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas 3x por vetor viral. O sobrenadante de células EXPI293 retransduzidas com vetores virais que induziram a integração do gene para expressão das proteínas dos sorotipos 3 e 4 do vírus da Dengue foram coletados, concentrados 10x utilizando filtro Amicon de 10kDa e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, em seguida, transferidos para membrana de nitrocelulose para avaliação em Western Blot. (WT) células EXPI293 não transduzidas.

5.16 Purificação da proteína de envelope dos 4 sorotipos do vírus da Dengue expressa de forma estável em células EXPI 293 após transdução com vetor viral.

Uma vez demonstrada a presença das proteínas de interesse nos sobrenadantes das culturas, estas foram preparadas para a purificação por cromatografia líquida de afinidade em coluna de níquel utilizando a coluna *HisTrap excel* (GE Healthcare Life Sciences) em aparelho ÄKTA Pure™ *Protein Purification System* (Cytiva™). Os sobrenadantes foram filtrados em filtro 0,22µm e posteriormente passados pela coluna. As frações pós eluição foram analisadas em SDS-PAGE.

Para os sorotipos 1 e 2 foi possível observar uma discreta distorção na curva de detecção de UV durante a passagem das frações em que se obteve proteína purificada (Figura 27B e D). A distorção da curva de detecção de UV não foi observado para os sorotipos 3 e 4, em que a leitura corresponde a emissão do tampão contendo imidazol. O cromatograma correspondente a purificação de proteína de DENV3 está representado na Figura 27C e se reproduziu para DENV4. Cada fração obtida após a eluição foi composta por 1,8mL de eluato. Nas frações 6-9 é possível observar uma banda única com massa molecular de aproximadamente 55kDa, esperada para a proteína E de DENV 1 (Figura 27 A); Nas frações 5-10 é possível observar uma banda única com massa molecular de aproximadamente 55kDa, esperada para a proteína E de DENV 2 (Figura 27C); Nas frações 4-6 é possível observar uma discreta banda com massa molecular de aproximadamente 55kDa, esperada para a proteína E de DENV 3 (Figura 28A); Nas frações 4-7 é possível observar uma banda única com massa molecular de aproximadamente 55kDa, esperada para a proteína E de DENV 4 (Figura 28B).

Foi possível purificar as proteínas de envelope dos 4 sorotipos do vírus da Dengue por meio de cromatografia de afinidade em coluna de níquel, ainda que em baixas concentrações.

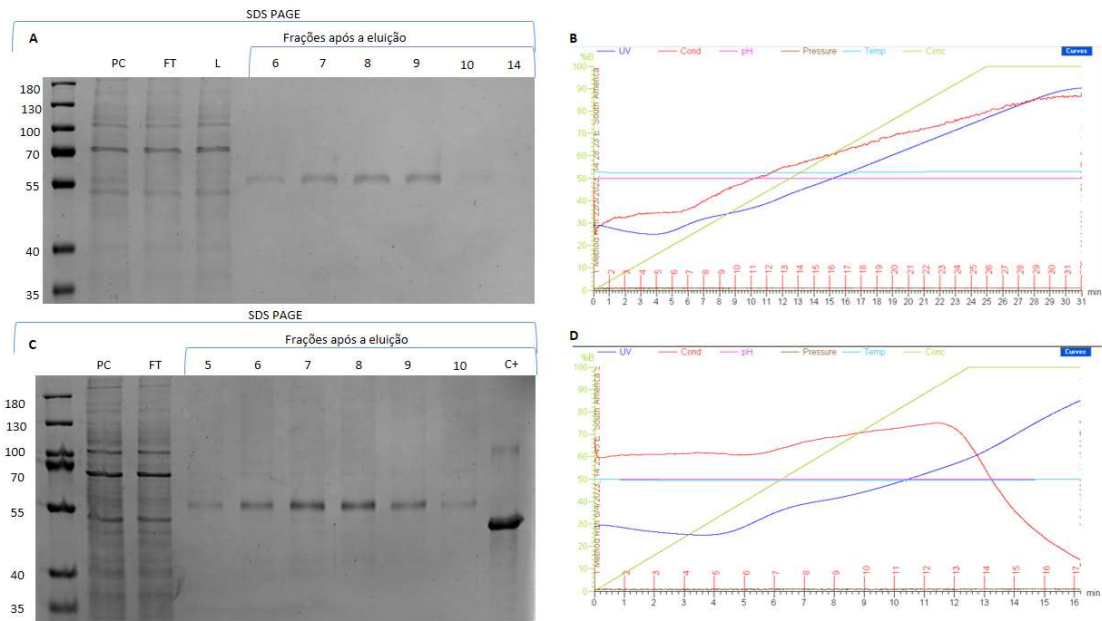


Figura 27 - Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel da proteína de envelope dos sorotipos 1 e 2 do vírus da Dengue expressas de forma estável em células EXPI293 transduzidas. (A) SDS-PAGE das frações eluídas após a purificação da proteína E de DENV1. PC: Amostra pré coluna – Sobrenadante de EXPI293 coletado após a recuperação das culturas selecionadas com puromicina FT: Flow through - Fração que não se ligou à coluna de afinidade. L: amostra da lavagem da coluna. F6-F14: Frações eluídas da coluna utilizando tampão com 500mM de imidazol. **(B)** Cromatograma da purificação. **(C)** SDS-PAGE das frações eluídas após a purificação da proteína E de DENV2 PC: Amostra pré coluna – Sobrenadante de EXPI293 coletado após a recuperação das culturas selecionadas com puromicina FT: Flow through - Fração que não se ligou à coluna de afinidade. F5-F10: Frações eluídas da coluna utilizando tampão com 500mM de imidazol. C+: *E DENV2 produzida em procarioto*. **(D)** Cromatograma da purificação

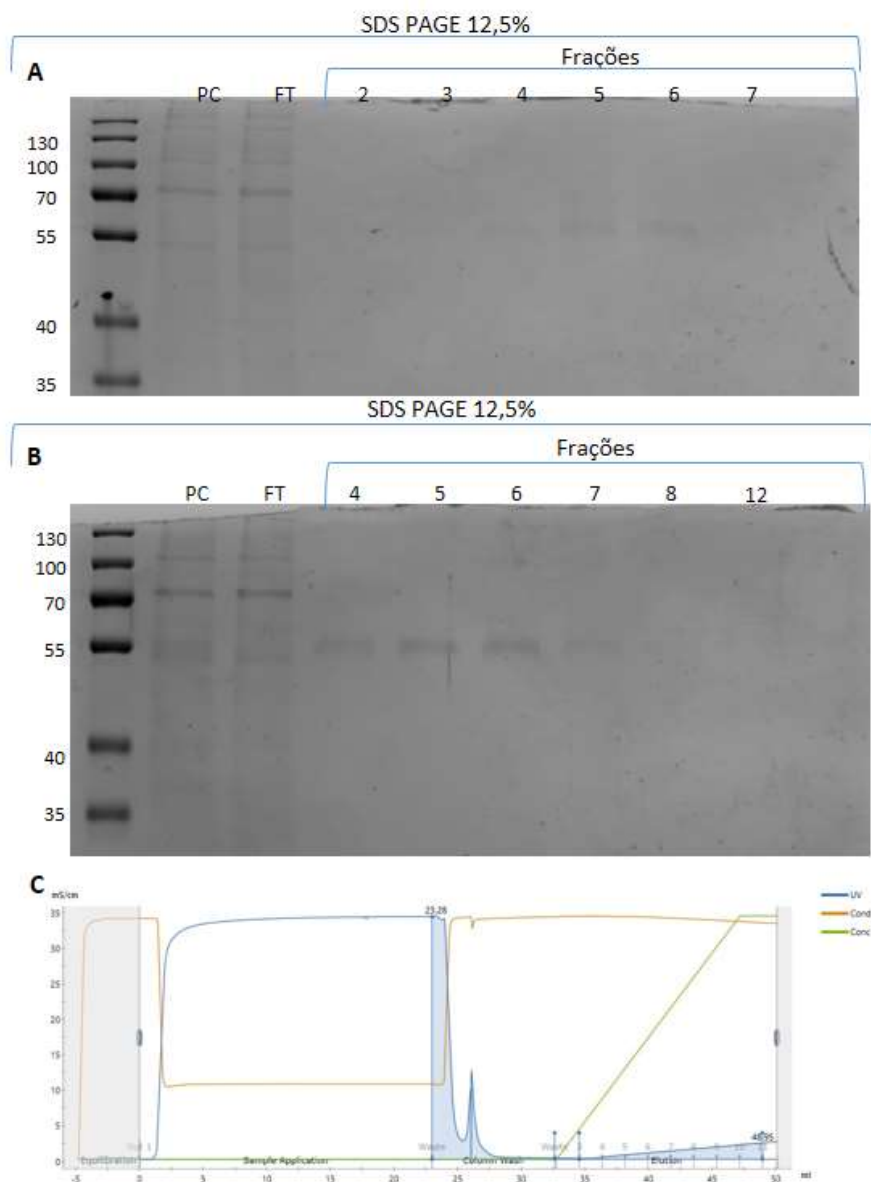


Figura 28 - Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel da proteína de envelope dos sorotipos 3 e 4 do vírus da Dengue expressas de forma estável em células EXPI293 transduzidas. (A) SDS-PAGE das frações eluídas após a purificação da proteína E de DENV3. PC: Amostra pré coluna – Sobrenadante de EXPI293 coletado após a recuperação das culturas selecionadas com puromicina FT: Flow through - Fração que não se ligou à coluna de afinidade. F2-F8: Frações eluídas da coluna utilizando tampão com 500mM de imidazol. **(B)** SDS-PAGE das frações eluídas após a purificação da proteína E de DENV4. PC: Amostra pré coluna – Sobrenadante de EXPI293 coletado após a recuperação das culturas selecionadas com puromicina FT: Flow through - Fração que não se ligou à coluna de afinidade. F4-F14: Frações eluídas da coluna utilizando tampão com 500mM de imidazol. **(C)** Cromatograma da purificação da proteína E de DENV3.

5.18 Expressão transiente da proteína E₂ do vírus Chikungunya em células EXPI293 utilizando pcDNA3.1

As células EXPI293 também foram utilizadas para produção da proteína E₂ do vírus Chikungunya inicialmente de forma transiente. Células EXPI293 foram transfectadas com 25µg de pcDNA3.1 + CHIKV E₂ utilizando como veículo de transfecção a *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) e o meio *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher). 4 dias após a transfecção as células foram centrifugadas e ressuspensas em novo meio contendo 400ng/mL de G418 (antibiótico de seleção). O sobrenadante foi coletado, filtrado com filtro 0,22µm e submetido a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel utilizando a coluna *HisTrap excel* (GE Healthcare Life Sciences) em aparelho ÄKTA Pure™ Protein Purification System (Cytiva™). No cromatograma da purificação foi possível observar discreta distorção na curva de detecção de UV durante a passagem das frações 9 e 10, em que se obteve proteína purificada (Figura 29B). As amostras obtidas após a eluição foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 29A) e o pool das frações mais concentradas analisado em SDS-PAGE (Figura 29C), Western-Blot E₂ policlonal de coelho (Sigma) (Figura 29D) e Anti His tag (Figura 29E).

O *pool* das frações purificadas de proteína E₂ (3,6mL) foi quantificado obtendo-se 210ng/µL. O rendimento final da produção foi de 756µg de proteína, obtidos a partir de 25mL de sobrenadante das culturas 30µg/mL de cultivo.

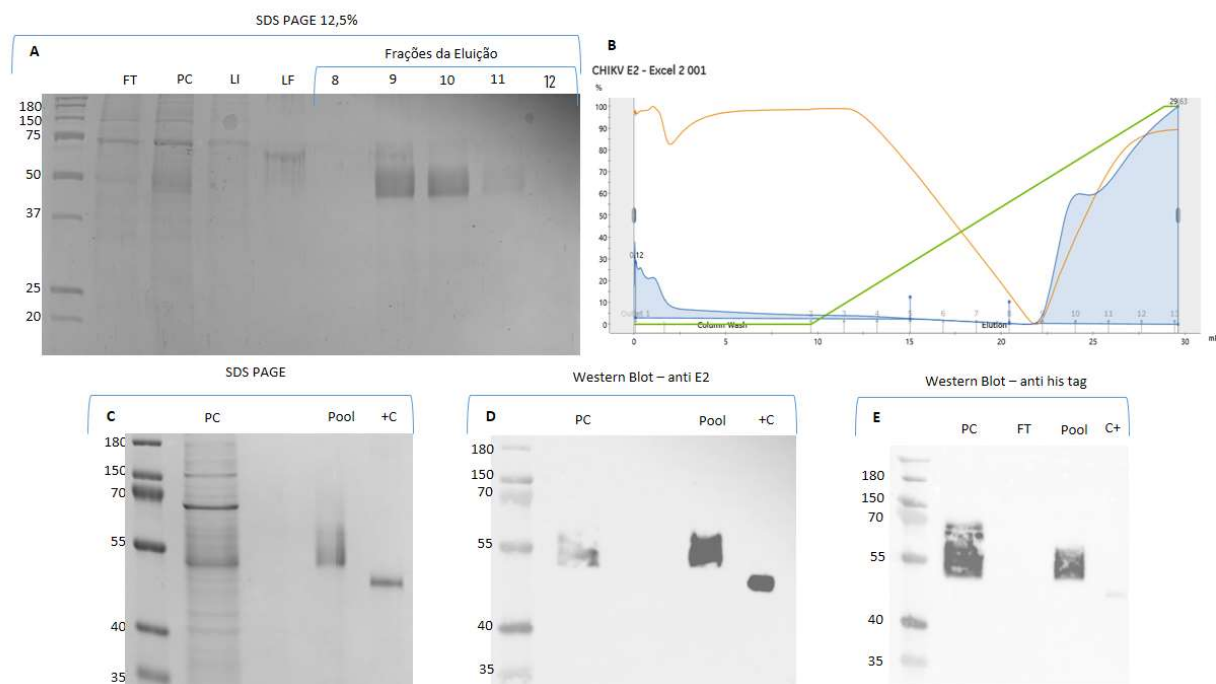


Figura 29 – Produção e purificação por cromatografia de afinidade da proteína E₂ do vírus Chikungunya expressa de forma transiente em células EXPI293. (A) SDS-PAGE das frações eluídas após a purificação da proteína E₂ de CHIKV. PC: Amostra pré coluna – Sobrenadante de EXPI293 coletado 4 dias após a transfecção. FT: Flow through - Fração que não se ligou à coluna de afinidade. LI: amostra inicial da lavagem da coluna LF: amostra final da lavagem da coluna. F8-F12: Frações eluídas da coluna utilizando tampão com 500mM de imidazol. (B) Cromatograma da purificação apresentando discreta distorção da curva de detecção de UV entre as frações 9 e 10, em que se obteve proteína purificada. Avaliação do pool final das amostras 9 e 10 em SDS-PAGE comparado com (C+) 1µg da proteína E₂ de CHIKV expressa em procarioto utilizada como controle positivo em (C) SDS-PAGE (D) Western blot com anticorpo anti E₂ e (E) Western blot com anticorpo anti his tag.

5.19 Avaliação da aplicação da proteína E₂ de CHIKV expressa em células EXPI293 no diagnóstico por ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG anti CHIKV em amostras de soro humano.

A proteína CHIKV-E₂ purificada e quantificada teve sua antigenicidade avaliada em ELISA seguindo protocolo previamente estabelecido por Queiroz, 2023. Soros individuais de pacientes positivos e negativos para CHIKV, foram utilizados para determinar a capacidade de captura da proteína tanto para IgG, quanto para de IgM.

Nos ensaios, foram utilizados 48 soros positivos, 29 doados pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN/PE) e 18 pela Fundação Ezequiel Dias – FUNED MG, confirmados através de PCR e/ou diagnósticos clínicos. Os 32 soros negativos foram coletados de colaboradores do CT Vacinas. Quando recebidos no CT Vacinas, todos os soros foram categorizados previamente também pelos kits IgM/IgG Euroimmun.

No ELISA IgM foram utilizados 800 ng por poço de CHIKV-E₂ expressa em EXPI293 e o teste apresentou 85% de sensibilidade e 97% de especificidade.

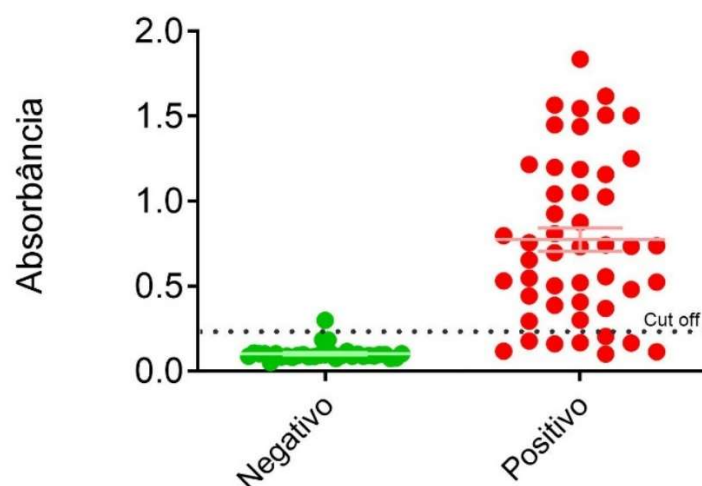


Gráfico 5 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA para detecção de anticorpos do tipo IgM utilizando a proteína E₂ de CHIKV expressa em EXPI293. Das 48 amostras positivas avaliadas, 40 foram corretamente identificadas pelo teste, 7 amostras foram consideradas negativas e 1 foi considerada amostra indeterminada. Das 32 amostras negativas avaliadas, 31 foram corretamente identificadas pelo teste e 1 amostra foi considerada positiva. Conferindo ao teste sensibilidade de 85% e especificidade de 97%.

Amostra x Absorbância x Índice para IgM

Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice
BR	0,051	0,22	5021	0,743	3,15	LACEN16	0,388	1,65
M10	0,095	0,40	4833	1,835	7,79	LACEN17	0,654	2,78
C17S3	0,102	0,43	4612	0,524	2,22	LACEN18	0,732	3,11
L8P	0,089	0,38	5059	0,809	3,43	LACEN19	1,200	5,10
NB	0,184	0,78	4766	0,114	0,48	LACEN20	1,546	6,56
HIS	0,090	0,38	4984	1,158	4,92	LACEN21	0,301	1,28
J1P	0,100	0,42	4997	1,042	4,42	LACEN22	0,502	2,13
NM	0,092	0,39	5046	0,160	0,68	LACEN23	0,118	0,50
PACC	0,091	0,39	4638	0,481	2,04	LACEN24	1,449	6,15
RAF	0,074	0,31	4708	0,926	3,93	LACEN25	0,798	3,39
S13S	0,088	0,37	5022	0,521	2,21	LACEN26	0,177	0,75
LMNP	0,088	0,37	4561	0,168	0,71	LACEN27	0,442	1,88
SSM	0,094	0,40	4591	0,165	0,70	LACEN28	0,295	1,25
GGR	0,299	1,27	4603	0,204	0,87	LACEN29	0,875	3,72
TAT	0,098	0,42	5074	0,100	0,42	LACEN30	1,618	6,87
LBPFF	0,081	0,34	5026	1,439	6,11	ALCM	0,547	2,32
BSASS	0,088	0,37	4844	1,187	5,04			
cat	0,184	0,78	4795	1,250	5,31			
clbassc	0,084	0,36	LACEN02	1,050	4,46			
CPQ	0,075	0,32	LACEN03	0,756	3,21			
crrb	0,078	0,33	LACEN04	0,555	2,36			
GABC	0,085	0,36	LACEN05	0,369	1,57			
JGO	0,103	0,44	LACEN06	0,697	2,96			
nshs	0,105	0,45	LACEN07	0,530	2,25			
SCT10	0,098	0,42	LACEN08	1,215	5,16			
TFSN	0,092	0,39	LACEN09	0,734	3,12			
J25	0,102	0,43	LACEN10	1,026	4,36			
L9S	0,098	0,42	LACEN11	1,506	6,39			
LG	0,082	0,35	LACEN12	0,738	3,13			
C16P3	0,108	0,46	LACEN13	0,407	1,73			
GRG	0,103	0,44	LACEN14	1,566	6,65			
GMF	0,115	0,49	LACEN15	1,505	6,39			

No ELISa IgG foram utilizados 200 ng por poço de CHIKV-E2 expressa em EXP1293 e o teste apresentou 98% de sensibilidade e 100% de especificidade.

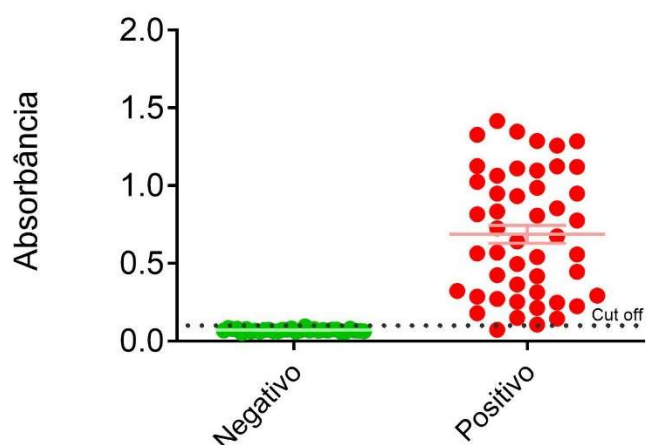


Gráfico 6 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA para detecção de anticorpos do tipo IgG utilizando a proteína E2 de CHIKV expressa em EXP1293. Das 48 amostras positivas avaliadas, 47 foram corretamente identificadas pelo teste, 1 foi considerada amostra indeterminada. Das 32 amostras negativas avaliadas, 24 foram corretamente identificadas pelo teste e 8 amostras foram consideradas indeterminadas. Conferindo ao teste sensibilidade de 98% e especificidade de 100%.

Amostra x Absorbância x Índice para IgG

Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice
BR	0,052	0,54	5021	0,180	1,87	LACEN16	1,286	13,37
M10	0,084	0,87	4833	0,569	5,92	LACEN17	1,258	13,08
C17S3	0,078	0,81	4612	0,252	2,62	LACEN18	1,110	11,54
L8P	0,075	0,78	5059	0,322	3,35	LACEN19	0,949	9,87
NB	0,062	0,64	4766	1,328	13,81	LACEN20	0,314	3,26
HIS	0,079	0,82	4984	0,726	7,55	LACEN21	0,557	5,79
J1P	0,079	0,82	4997	0,224	2,33	LACEN22	0,834	8,67
NM	0,059	0,61	5046	1,415	14,71	LACEN23	0,674	7,01
PACC	0,073	0,76	4638	0,854	8,88	LACEN24	1,065	11,07
RAF	0,066	0,69	4708	0,364	3,78	LACEN25	0,816	8,48
S13S	0,078	0,81	5022	0,496	5,16	LACEN26	0,293	3,05
LMNP	0,061	0,63	4561	1,348	14,01	LACEN27	0,213	2,21
SSM	0,067	0,70	4591	1,125	11,70	LACEN28	0,540	5,61
GGR	0,066	0,69	4603	0,986	10,25	LACEN29	0,775	8,06
TAT	0,094	0,98	5074	1,124	11,69	LACEN30	0,564	5,86
LBPFF	0,061	0,63	5026	0,808	8,40	ALCM	0,144	1,50
BSASS	0,075	0,78	4844	0,286	2,97			
cat	0,063	0,65	4795	0,640	6,65			
clbassc	0,070	0,73	LACEN02	0,446	4,64			
CPQ	0,063	0,65	LACEN03	0,932	9,69			
crrb	0,071	0,74	LACEN04	0,106	1,10			
GABC	0,068	0,71	LACEN05	0,424	4,41			
JGO	0,060	0,62	LACEN06	1,287	13,38			
nshs	0,060	0,62	LACEN07	0,073	0,76			
SCT10	0,068	0,71	LACEN08	1,120	11,64			
TFSN	0,067	0,70	LACEN09	0,150	1,56			
J25	0,069	0,72	LACEN10	0,417	4,34			
L9S	0,073	0,76	LACEN11	0,271	2,82			
LG	0,068	0,71	LACEN12	0,247	2,57			
C16P3	0,081	0,84	LACEN13	1,025	10,66			
GRG	0,073	0,76	LACEN14	1,098	11,41			
GMF	0,078	0,81	LACEN15	0,950	9,88			

5.20 Expressão estável da proteína E2 de Chikungunya vírus utilizando pcDNA3.1 sob pressão seletiva e purificação de novo lote.

Como a proteína E2 expressa em células EXPI293 pareceu se mostrar um bom antígeno para aplicação em ELISA, tornou-se necessário estabelecer linhagens com expressão estável de células EXPI293 para produção da proteína E₂, o que viabiliza a prototipagem e comercialização de possíveis testes em função da diminuição dos custos e melhor reprodutibilidade. A cultura anteriormente transfectada foi selecionada com antibiótico G418 e se recuperou, sendo submetida a sucessivas passagens e demonstrando continuidade da expressão mesmo com seleção tardia. Visando melhorar os níveis de expressão, células EXPI293 foram novamente transfectadas com 25µg de pcDNA3.1 + CHIKV E₂ utilizando 3 diferentes protocolos: No primeiro deles não foi adicionado enhancer 24h após transfecção, no segundo, a transfecção foi realizada exatamente como sugerido pelo fabricante da *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) com adição de *enhancer*, e no terceiro cultura previamente selecionada com G418 foi retransfectada, também seguindo o protocolo do fabricante. Vinte e quatro horas após a transfecção ou após a adição do enhancer as culturas foram acrescidas de antibiótico de seleção (G418) e 5 dias após a transfecção as células foram centrifugadas e ressuspensas em novo meio contendo G418. O sobrenadante foi coletado e as amostras de extrato (E) e sobrenadante (S) analisadas em SDS-PAGE (Figura 30A) e Western-Blot Anti His tag (Figura 30B). Os resultados da transfecção de células EXPI293 com pcDNA3.1 + CHIKV E₂ adicionando enhancer sugerem melhores níveis de expressão da proteína recombinante, por isso, esse foi o protocolo escolhido para continuidade dos experimentos. O sobrenadante dessa cultura foi filtrado com filtro 0,22µm e submetido a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, desta vez utilizando a coluna HisTrap™ High Performance (Cytiva™) em aparelho ÄKTA Pure™ Protein Purification System (Cytiva™). Cada fração obtida após a eluição continha por 1,8mL de eluato. Nas frações 5 e 6 (Figura 31A) é possível observar banda espessa e difusa na altura esperada para a proteína E₂ de CHIKV. O pool obtido a partir das frações 5 e 6 foi

analisado em SDS-PAGE (Figura 31B) em comparação com a amostra anterior de proteína produzida em EXPI293 (P1).

O *pool* das frações purificadas de proteína E₂ (3,6mL) foi quantificado obtendo-se 240ng/μL. O rendimento final da produção foi de 864μg de proteína, obtidos a partir de 25mL de sobrenadante das culturas. 34,6μg/mL de cultivo.

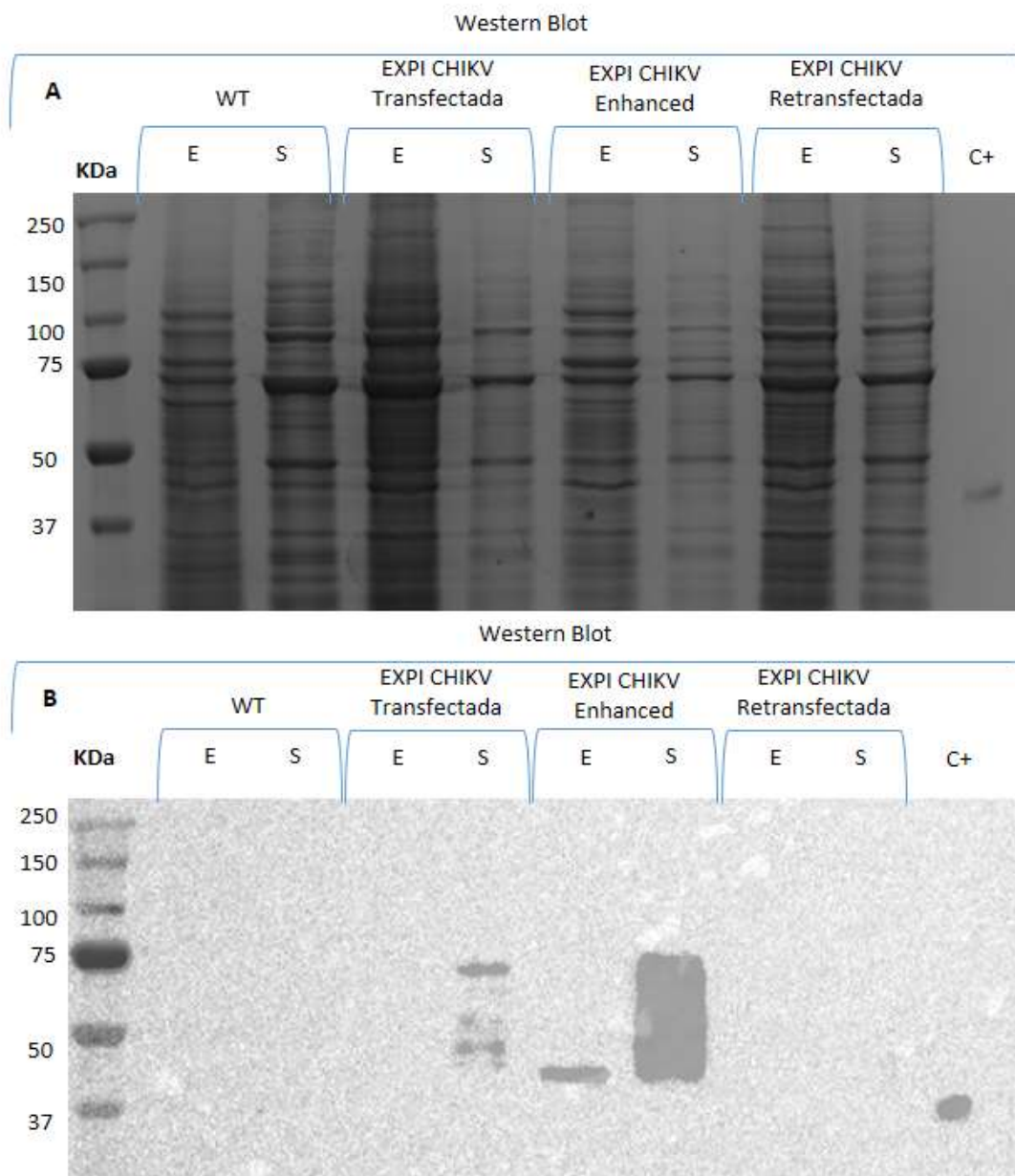


Figura 30 - SDS-PAGE (A) e Western Blot com anticorpo Anti His tag (B) do sobrenadante e extrato de células EXPI293 transfectadas com pcDNA3.1 + CHIKV E2. Os sobrenadantes e extratos de células EXPI293 transfectadas seguindo os 3 protocolos: sem adição de enhancer, com adição de enhancer e retransfectada foram submetidos a eletroforese em gel de poliácridamida 12,5%, em seguida, transferidos para membrana de nitrocelulose para avaliação no ensaio de Western Blot anti His tag em que foram observadas bandas que indicam a expressão da proteína E2 tanto no extrato quanto no sobrenadante da cultura transfectada com adição de enhancer. E no controle positivo (C+): proteína E2 expressa em procarioto.

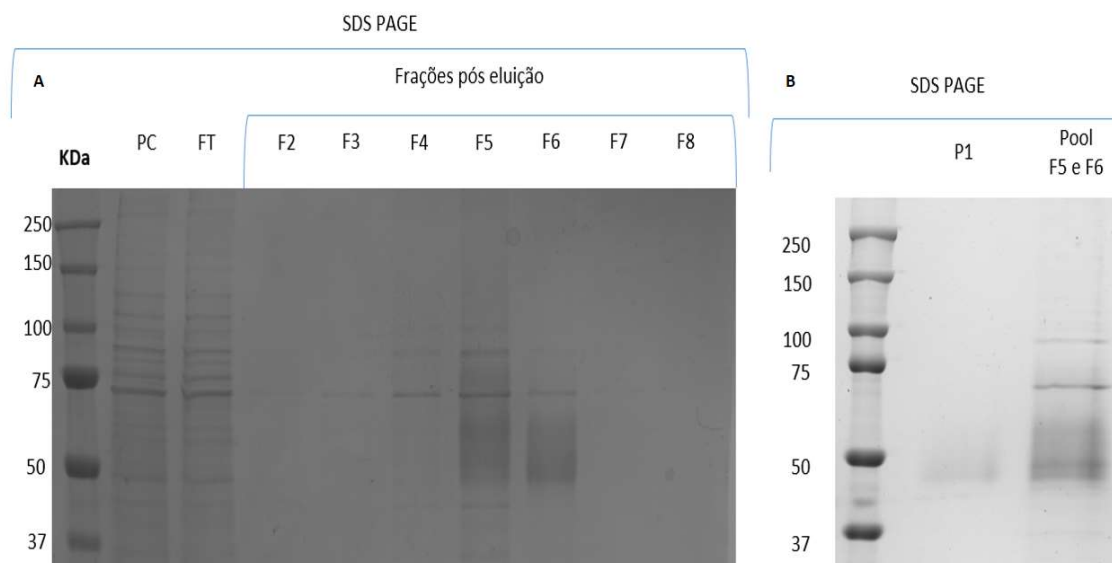


Figura 31 – Purificação por cromatografia de afinidade de novo lote da proteína E₂ do vírus Chikungunya expressa em células EXPI293. (A) SDS-PAGE das frações eluídas após a purificação da proteína E₂ de CHIKV. PC: Amostra pré coluna – Sobrenadante de EXPI293 coletado 5 dias após a transfecção e seleção com G418. FT: Flow through - Fração que não se ligou à coluna de afinidade. F2-F8: Frações eluídas da coluna utilizando tampão com 500mM de imidazol. (B) SDS-PAGE comparando o pool das frações 5 e 6 com a o lote anterior de produção e purificação de proteína CHIKV E₂ em EXPI (P1).

5.21 Produção e purificação da proteína E₂ de Chikungunya vírus em *Escherichia coli* BL21

Para a comparação do resultado do ELISA utilizando a proteína E₂ expressa em EXPI293 e a proteína E₂ produzida em *Escherichia coli*, foi utilizada uma linhagem de *E.coli* transformada com pET_21_CHIKV_E2, como descrito padronizado por Bagno, 2020. As amostras da cultura antes e depois da indução e amostra solubilizada overnight em tampão com 8M de ureia foram analisadas em SDS PAGE (Figura 32A). Em seguida procedeu-se a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel utilizando a coluna HisTrap™ High Performance (Cytiva™) em aparelho ÄKTA Pure™ Protein Purification System (Cytiva™). Cada fração obtida após a eluição continha por 1,8mL de eluato. Nas frações 7 - 13 (Figura 32B) é possível observar uma banda

única e concentrada no tamanho esperado para a proteína E2 de CHIKV não glicosilada. Um pico de eluição de proteína é observado na curva de detecção de UV do cromatograma durante a passagem das frações em que se obteve proteína purificada (Figura 32C). O pool obtido a partir das frações mais concentradas (8-12) foi analisado em SDS-PAGE (Figura 32D) em comparação com BSA comercial em duas concentrações

O *pool* das frações purificadas de proteína E₂ (9mL) foi quantificado obtendo-se 1,3µg/µL. O rendimento final da produção foi de 11,7mg de proteína, obtidos a partir de 250mL de cultivo. 46µg/mL de cultivo.

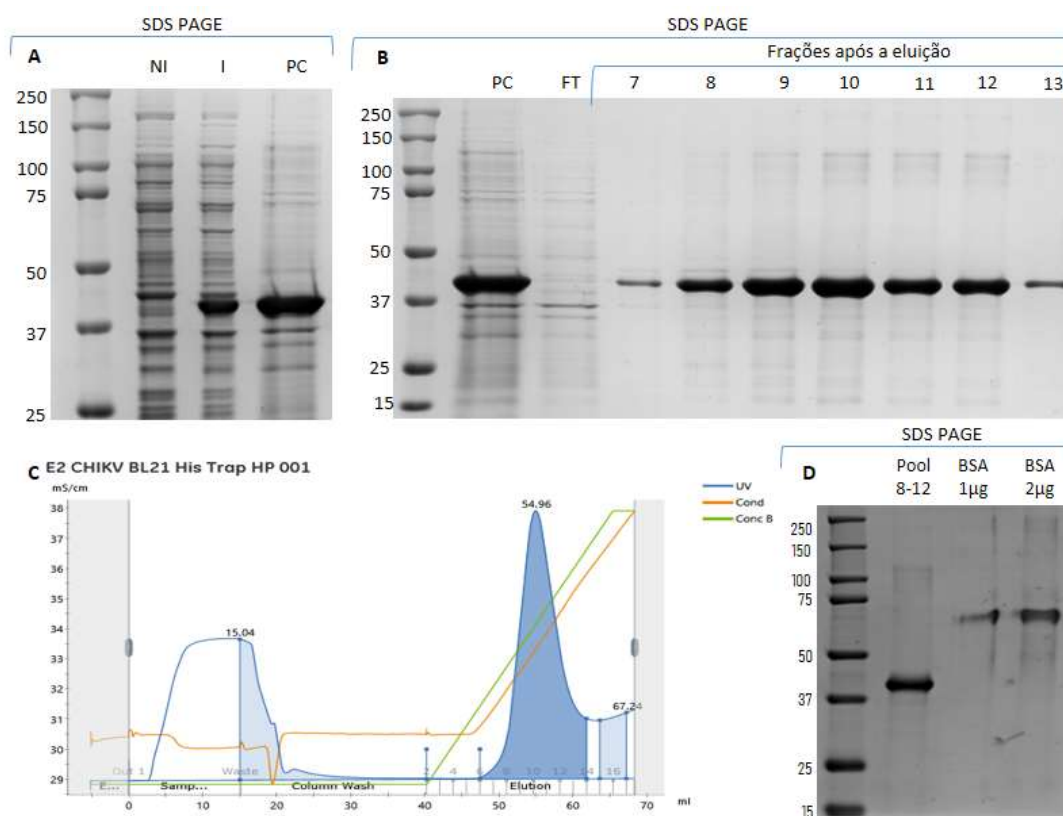


Figura 32 – Produção e purificação por cromatografia de afinidade da proteína E₂ do vírus Chikungunya expressa em *Escherichia coli* BL21. (A e B) SDS-PAGE. NI: Extrato total de cultura não induzida. I: Extrato total de cultura induzida. PC: Amostra pré coluna – Fração insolúvel após solubilização overnight em tampão com 8M de uréia. FT: Flow through - Fração que não se ligou à coluna de afinidade. F7-F13: Frações eluídas da coluna utilizando tampão com 500mM de imidazol. (C) Cromatograma da purificação demonstrando o pico de eluição de proteína, observado na curva de detecção de UV durante a passagem das frações em que se obteve proteína purificada (7-13). Avaliação do pool final das frações 8-12 em SDS-PAGE comparado com 1 e 2 µg de BSA comercial.

5.22 ELISA comparativo com a proteína E2 de Chikungunya vírus, produzida em BL21 e em EXPI293

Novos ensaios foram realizados para avaliar a aplicação da proteína E₂ de CHIKV expressa em células EXPI293 em comparação com a mesma proteína expressa em BL21 em diagnóstico por ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG anti CHIKV em amostras de soro humano.

Soros individuais de pacientes positivos e negativos para CHIKV, foram utilizados para determinar a capacidade de captura da proteína tanto para IgG, quanto para de IgM.

Nos ensaios, foram utilizados 52 soros positivos para IgM e 59 soros positivos para IgG, doados pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN/PE) e pela Fundação Ezequiel Dias – FUNED MG, confirmados através de PCR e/ou diagnóstico clínico. Os soros negativos foram coletados de colaboradores do CT Vacinas. Quando recebidos no CT Vacinas, todos os soros foram categorizados previamente também pelos kits IgM/IgG Euroimmun

No ELISA IgM foram utilizados 800 ng por poço de CHIKV-E2 para ambas as plataformas de expressão. Nesse teste, as amostras foram categorizadas segundo caracterização por kit Euroimmun. A proteína expressa em BL21 apresentou 67% de sensibilidade e 100% de especificidade, enquanto a expressa em EXPI293 apresentou 83% de sensibilidade e 100% de especificidade.

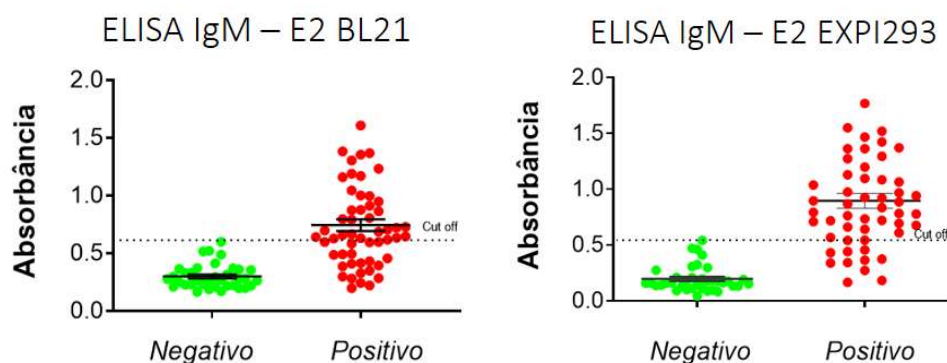


Gráfico 7 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA para detecção de anticorpos do tipo IgM utilizando a proteína E2 de CHIKV expressa em BL21 x a proteína E2 expressa em EXPI293. No ELISA cuja placa foi sensibilizada com a proteína expressa em BL21 (A) das 52 amostras positivas avaliadas, 26 foram corretamente identificadas pelo teste, 13 amostras foram consideradas negativas e 13 foram consideradas indeterminadas. Das 36 amostras negativas avaliadas, 33 foram corretamente identificadas pelo teste e 3 amostras foram consideradas indeterminadas. Conferindo ao teste sensibilidade de 67% e especificidade de 100%. No ELISA cuja placa foi sensibilizada com a proteína expressa em EXPI293 (B) das 52 amostras positivas avaliadas, 40 foram corretamente identificadas pelo teste, 8 amostras foram consideradas negativas e 4 foram consideradas indeterminadas. Das 36 amostras negativas avaliadas, 34 foram corretamente identificadas pelo teste e 2 amostras foram consideradas indeterminadas. Conferindo ao teste sensibilidade de 83% e especificidade de 100%.

Amostra x Absorbância x Índice - ELISA IgM proteína E2 produzida em BL21

Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice
BR	0,047	0,08	4916	0,646	1,05	LACEN17	0,221	0,36
A14/04/16	0,276	0,45	4600	0,414	0,68	LACEN18	1,045	1,70
C17S3	0,170	0,28	5021	0,385	0,63	LACEN19	0,631	1,03
L8P	0,223	0,36	4833	1,001	1,63	LACEN20	0,685	1,12
NB	0,521	0,85	4612	0,806	1,31	LACEN21	0,350	0,57
HIS	0,218	0,36	5059	0,583	0,95	LACEN22	0,494	0,81
J1P	0,316	0,52	4766	0,197	0,32	LACEN23	0,430	0,70
NM	0,268	0,44	4984	0,872	1,42	LACEN24	0,796	1,30
PACC	0,250	0,41	4997	0,721	1,18	LACEN25	1,367	2,23
RAF	0,217	0,35	5046	0,327	0,53	LACEN26	0,280	0,46
S13S	0,281	0,46	4638	0,617	1,01	LACEN27	0,297	0,48
LMNP	0,515	0,84	4708	0,911	1,49	LACEN28	0,705	1,15
SSM	0,263	0,43	5022	0,790	1,29	LACEN29	0,698	1,14
GGR	0,412	0,67	5026	0,995	1,62	LACEN30	1,233	2,01
TAT	0,231	0,38	4844	0,634	1,03			
LBPFF	0,261	0,43	4795	0,658	1,07			
BSASS	0,298	0,49	4613	1,189	1,94			
cat	0,295	0,48	4625	0,598	0,97			
clbasc	0,371	0,60	5095	0,456	0,74			
CPQ	0,209	0,34	5047	0,394	0,64			
crb	0,197	0,32	4642	1,608	2,62			
GABC	0,209	0,34	ALCM	0,284	0,46			
JGO	0,166	0,27	BO310323	0,627	1,02			
nshs	0,359	0,59	LACEN02	0,728	1,19			
SCT10	0,370	0,60	LACEN03	0,875	1,43			
TFSN	0,271	0,44	LACEN04	0,641	1,05			
J25	0,278	0,45	LACEN05	1,304	2,13			
L9S	0,227	0,37	LACEN07	0,243	0,40			
LG	0,229	0,37	LACEN08	1,382	2,25			
C16P3	0,195	0,32	LACEN09	0,598	0,98			
GRG	0,330	0,54	LACEN10	0,594	0,97			
GMF	0,599	0,98	LACEN11	1,355	2,21			
sct04-LGO	0,365	0,60	LACEN12	0,664	1,08			
4584	0,488	0,80	LACEN13	0,864	1,41			
5078	0,329	0,54	LACEN14	0,410	0,67			
4591	0,355	0,58	LACEN15	0,947	1,54			
5074	0,187	0,30	LACEN16	0,485	0,79			

Amostra x Absorbância x Índice - ELISA IgM proteína E2 produzida em EXPI293

Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice
BR	0,045	0,08	4916	1,363	2,51	LACEN17	0,641	1,18
A14/04/16	0,183	0,34	4600	0,455	0,84	LACEN18	0,721	1,33
C17S3	0,145	0,27	5021	0,926	1,71	LACEN19	1,096	2,02
L8P	0,161	0,30	4833	1,768	3,26	LACEN20	1,370	2,52
NB	0,324	0,60	4612	0,695	1,28	LACEN21	0,610	1,12
HIS	0,411	0,76	5059	0,868	1,60	LACEN22	0,567	1,04
J1P	0,111	0,20	4766	0,182	0,33	LACEN23	0,374	0,69
NM	0,133	0,25	4984	0,968	1,78	LACEN24	1,273	2,34
PACC	0,091	0,17	4997	0,974	1,79	LACEN25	0,763	1,40
RAF	0,087	0,16	5046	0,166	0,31	LACEN26	0,273	0,50
S13S	0,157	0,29	4638	0,661	1,22	LACEN27	0,430	0,79
LMNP	0,195	0,36	4708	1,037	1,91	LACEN28	0,343	0,63
SSM	0,183	0,34	5022	0,541	1,00	LACEN29	0,834	1,54
GGR	0,298	0,55	5026	1,362	2,51	LACEN30	1,519	2,80
TAT	0,471	0,87	4844	1,198	2,21			
LBPFF	0,174	0,32	4795	1,466	2,70			
BSASS	0,173	0,32	4613	0,777	1,43			
cat	0,460	0,85	4625	0,941	1,73			
clbassc	0,140	0,26	5095	0,793	1,46			
CPQ	0,096	0,18	5047	0,365	0,67			
crb	0,158	0,29	4642	1,422	2,62			
GABC	0,162	0,30	ALCM	0,709	1,31			
JGO	0,161	0,30	BO310323	0,886	1,63			
nshs	0,191	0,35	LACEN02	0,920	1,69			
SCT10	0,132	0,24	LACEN03	0,676	1,24			
TFSN	0,308	0,57	LACEN04	0,735	1,35			
J25	0,138	0,25	LACEN05	0,339	0,62			
L9S	0,207	0,38	LACEN07	0,544	1,00			
LG	0,211	0,39	LACEN08	1,084	2,00			
C16P3	0,153	0,28	LACEN09	0,782	1,44			
GRG	0,112	0,21	LACEN10	1,064	1,96			
GMF	0,083	0,15	LACEN11	1,130	2,08			
sct04-LGO	0,133	0,25	LACEN12	0,895	1,65			
4584	0,540	0,99	LACEN13	0,440	0,81			
5078	0,274	0,50	LACEN14	1,294	2,38			
4591	0,176	0,32	LACEN15	1,549	2,85			
5074	0,100	0,18	LACEN16	0,718	1,32			

No ELISA IgG foram utilizados 200 ng por poço de CHIKV-E2 para ambas as plataformas de expressão. A proteína expressa em BL21 apresentou 92% de sensibilidade e 100% de especificidade, enquanto a expressa em EXP1293 apresentou 98% de sensibilidade e 100% de especificidade.

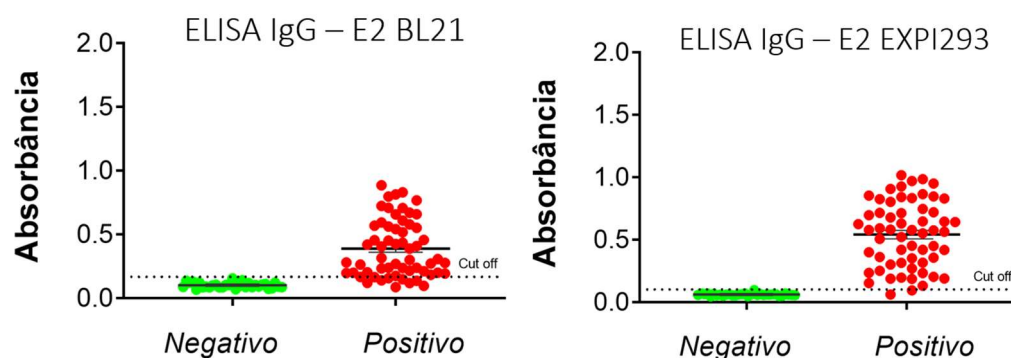


Gráfico 8 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA para detecção de anticorpos do tipo IgG utilizando a proteína E2 de CHIKV expressa em BL21 x a proteína E2 expressa em EXP1293. No ELISA cuja placa foi sensibilizada com a proteína expressa em BL21 (A) das 59 amostras positivas avaliadas, 47 foram corretamente identificadas pelo teste, 4 amostras foram consideradas negativas e 8 foram consideradas indeterminadas. Das 32 amostras negativas avaliadas, 29 foram corretamente identificadas pelo teste e 3 amostras foram consideradas indeterminadas. Conferindo ao teste sensibilidade de 92% e especificidade de 100%. No ELISA cuja placa foi sensibilizada com a proteína expressa em EXP1293 (B) das 59 amostras positivas avaliadas, 57 foram corretamente identificadas pelo teste, 1 amostra foi considerada negativa e 1 foi considerada indeterminada. Das 32 amostras negativas avaliadas, 30 foram corretamente identificadas pelo teste e 2 amostras foram consideradas indeterminadas. Conferindo ao teste sensibilidade de 97% e especificidade de 100%.

Amostra x Absorbância x Índice - ELISA IgG proteína E2 produzida em BL21

Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice
BR	0,040	0,24	4916	0,307	1,82	LACEN05	0,166	0,99
A14/04/16	0,156	0,92	4584	0,886	5,25	LACEN06	0,814	4,82
C17S3	0,120	0,71	5078	0,552	3,27	LACEN07	0,087	0,52
L8P	0,134	0,79	4600	0,562	3,33	LACEN08	0,671	3,98
NB	0,070	0,41	5021	0,272	1,61	LACEN09	0,097	0,58
HIS	0,091	0,54	4833	0,240	1,42	LACEN10	0,458	2,71
J1P	0,104	0,62	4612	0,140	0,83	LACEN11	0,149	0,88
NM	0,068	0,40	5059	0,184	1,09	LACEN12	0,138	0,82
PACC	0,093	0,55	4766	0,831	4,92	LACEN13	0,421	2,50
RAF	0,087	0,52	4984	0,213	1,26	LACEN14	0,518	3,07
S13S	0,141	0,83	4997	0,200	1,19	LACEN15	0,426	2,53
LMNP	0,074	0,44	5046	0,659	3,91	LACEN16	0,570	3,38
SSM	0,131	0,78	4638	0,410	2,43	LACEN17	0,657	3,90
GGR	0,087	0,52	4708	0,176	1,05	LACEN18	0,580	3,44
TAT	0,100	0,60	5022	0,264	1,56	LACEN19	0,707	4,19
LBPFF	0,085	0,50	4561	0,725	4,30	LACEN20	0,205	1,22
BSASS	0,094	0,56	4591	0,436	2,58	LACEN21	0,281	1,66
cat	0,106	0,63	4603	0,797	4,72	LACEN22	0,240	1,42
elbassc	0,088	0,52	5074	0,594	3,52	LACEN23	0,405	2,40
CPQ	0,078	0,46	5026	0,194	1,15	LACEN24	0,542	3,21
crb	0,091	0,54	4844	0,119	0,71	LACEN25	0,234	1,38
GABC	0,086	0,51	4795	0,710	4,20	LACEN26	0,269	1,60
JGO	0,113	0,67	4613	0,609	3,61	LACEN27	0,121	0,72
nshs	0,086	0,51	4956	0,453	2,68	LACEN28	0,238	1,41
SCT10	0,086	0,51	4625	0,158	0,94	LACEN29	0,301	1,78
TFSN	0,122	0,72	5095	0,198	1,17	LACEN30	0,168	0,99
J25	0,104	0,61	5047	0,768	4,55			
L9S	0,138	0,82	4642	0,277	1,64			
LG	0,106	0,63	ALCM	0,456	2,70			
C16P3	0,123	0,73	BO310323	0,215	1,27			
GRG	0,104	0,62	LACEN02	0,315	1,87			
GMF	0,089	0,53	LACEN03	0,389	2,31			
sct04-LGO	0,122	0,72	LACEN04	0,201	1,19			

Amostra x Absorbância x Índice - ELISA IgG proteína E2 produzida em EXPI293

Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice	Amostra	Abs.	Índice
BR	0,0398	0,45	4916	0,2051	2,32	LACEN05	0,3165	3,57
A14/04/16	0,0704	0,79	4584	0,9282	10,48	LACEN06	0,8663	9,78
C17S3	0,0643	0,73	5078	0,6311	7,13	LACEN07	0,0617	0,70
L8P	0,07	0,79	4600	0,8429	9,52	LACEN08	0,8479	9,57
NB	0,0552	0,62	5021	0,1907	2,15	LACEN09	0,154	1,74
HIS	0,056	0,63	4833	0,6466	7,30	LACEN10	0,3626	4,09
J1P	0,0682	0,77	4612	0,2364	2,67	LACEN11	0,1886	2,13
NM	0,0642	0,72	5059	0,2704	3,05	LACEN12	0,2343	2,65
PACC	0,055	0,62	4766	0,9065	10,24	LACEN13	0,6788	7,67
RAF	0,0605	0,68	4984	0,5069	5,72	LACEN14	0,7159	8,08
S13S	0,0643	0,73	4997	0,1876	2,12	LACEN15	0,6975	7,88
LMNP	0,0476	0,54	5046	0,9854	11,13	LACEN16	1,0184	11,50
SSM	0,0713	0,81	4638	0,8263	9,33	LACEN17	0,9698	10,95
GGR	0,061	0,69	4708	0,4011	4,53	LACEN18	0,8043	9,08
TAT	0,0651	0,74	5022	0,4185	4,73	LACEN19	0,5517	6,23
LBPFF	0,0639	0,72	4561	0,9508	10,74	LACEN20	0,2527	2,85
BSASS	0,0589	0,67	4591	0,7142	8,06	LACEN21	0,5233	5,91
cat	0,0534	0,60	4603	0,7469	8,43	LACEN22	0,582	6,57
elbassc	0,0534	0,60	5074	0,8336	9,41	LACEN23	0,5788	6,54
CPQ	0,0503	0,57	5026	0,5636	6,36	LACEN24	0,8312	9,39
errb	0,063	0,71	4844	0,3019	3,41	LACEN25	0,6245	7,05
GABC	0,057	0,64	4795	0,5788	6,54	LACEN26	0,3531	3,99
JGO	0,062	0,70	4613	0,4207	4,75	LACEN27	0,1975	2,23
nshs	0,0494	0,56	4956	0,6415	7,24	LACEN28	0,4506	5,09
SCT10	0,0591	0,67	4625	0,3147	3,55	LACEN29	0,5918	6,68
TFSN	0,0595	0,67	5095	0,4523	5,11	LACEN30	0,4214	4,76
J25	0,0624	0,70	5047	0,854	9,64			
L9S	0,0707	0,80	4642	0,7209	8,14			
LG	0,0625	0,71	ALCM	0,1316	1,49			
C16P3	0,097	1,10	BO310323	0,576	6,50			
GRG	0,0607	0,69	LACEN02	0,3565	4,03			
GMF	0,0603	0,68	LACEN03	0,6455	7,29			
sct04-LGO	0,0654	0,74	LACEN04	0,0946	1,07			

Para detecção de anticorpos do tipo IgG anti CHIKV os testes apresentam resultados comparáveis e seria mais vantajosa a utilização da proteína expressa em células procariontes. Para detecção de anticorpos do tipo IgM anti CHIKV a proteína expressa em células eucariontes demonstrou um desempenho melhor, com sensibilidade superior a 80%.

5.23 Expressão estável da proteína E2 de CHIKV utilizando o pcDNA3.1 sob pressão seletiva com G418

Uma nova transfecção foi realizada para testar a possibilidade de expressão estável da proteína de interesse por células EXPI293 a partir de uma transfecção com o plasmídeo pcDNA3.1 e manutenção sob pressão seletiva. Células EXPI293 foram transfectadas com 25µg de pcDNA3.1 + CHIKV E₂, o enhancer foi adicionado 24h após transfecção com *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) e as culturas (S) foram suplementadas com antibiótico de seleção (G418) 48h após a transfecção. 2 e 4 dias após a seleção (D2 e D4) foram coletadas amostras para a avaliação da expressão por SDS-PAGE (Figura 33A) e Western-Blot Anti His tag (Figura 33B) e 5 dias após a transfecção as células foram centrifugadas e ressuspensas em novo meio contendo G418.

Uma segunda cultura foi transfectada mas não foi submetida à seleção com G418 (NS). Uma banda de tamanho maior foi observada no ensaio de western blot nas amostras de D4 e pode corresponder a agregados de proteínas, ou dímeros, que não foram desfeitos pelo processo de desnaturação das amostras. Em ambas as culturas, selecionada e não selecionada com a droga, foi possível detectar a expressão da proteína de interesse 4 dias após a seleção, indicando que a transfecção ocorreu conforme esperado.

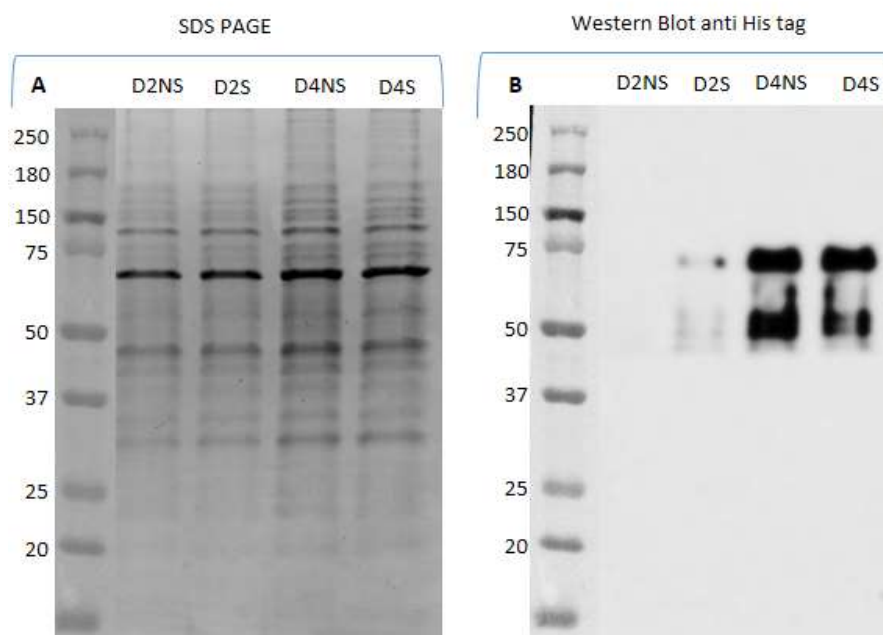


Figura 33 - SDS-PAGE (A) e Western Blot Anti His tag (B) do sobrenadante de células de células EXPI293 transfectadas com pcDNA3.1 + CHIKV E2. Os sobrenadantes de células EXPI293 transfectadas foram coletados 2 e 4 dias após a seleção com G418 e submetidos a eletroforese em gel de poliácridamida 12,5%, em seguida, transferidos para membrana de nitrocelulose para avaliação no ensaio de Western Blot anti His tag. Amostras selecionadas (D2S e D4S). Amostras não selecionadas (D2NS e D4NS).

Após a recuperação da cultura selecionada com G418, ao repicar as células foram geradas duas culturas, a primeira delas continuou a ser mantida na presença do antibiótico de seleção (Sel.), enquanto a segunda passou a ser mantida na ausência da droga (Sem G418). Ambas foram avaliadas em SDS-PAGE (Figura 34A) e Western Blot com anticorpo anti his (Figura 34B) para continuidade da expressão da proteína E2 de CHIKV. As culturas apresentavam diferentes densidades celulares no momento da coleta do sobrenadante, a cultura Selecionada e mantida sob pressão seletiva tinha $2,5 \times 10^6$ células por mL enquanto a cultura mantida na ausência do antibiótico tinha 10^6 células por mL.

Por meio desses ensaios, foi possível detectar por Western blot a continuidade da expressão na cultura mantida sob pressão seletiva (Figura 39B).

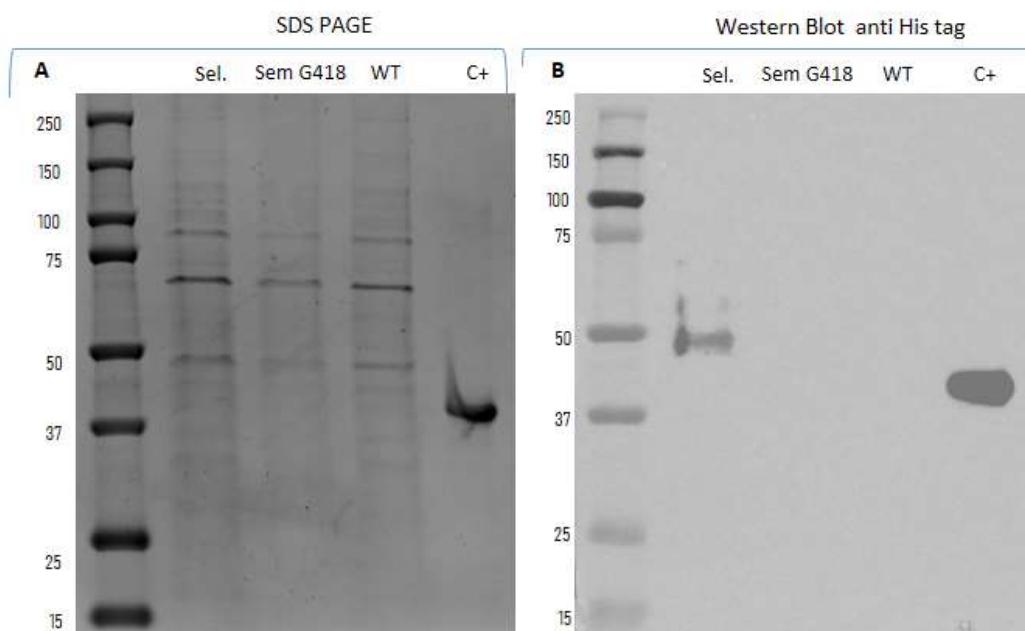


Figura 34 - SDS-PAGE (A) e Western Blot Anti His tag (B) do sobrenadante de células de células EXPI293 transfectadas com pcDNA3.1 + CHIKV E2 com e sem pressão seletiva. Os sobrenadantes de células EXPI293 transfectadas e mantidas na presença (Sel.) ou ausência (Sem G418) de pressão seletiva foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, em seguida, transferidos para membrana de nitrocelulose para avaliação no ensaio de Western Blot anti His tag em que foram observadas bandas que indicam a expressão da proteína E2 apenas na amostra mantida sob pressão seletiva e no C+: proteína E2 produzida em procarioto.

5.24 Purificação da proteína E2 de CHIKV expressa de forma estável utilizando o pcDNA3.1 sob pressão seletiva com G418

A cultura de células EXPI293 transfectadas com pcDNA3.1 + CHIKV E₂ e selecionada com 400ng/mL de G418 passou a ser mantida com repiques de acordo com o crescimento celular. Quatro dias após o repique com 3×10^5 células a cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi coletado. Após a filtração em filtro 0,22µm, esse sobrenadante foi submetido a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel utilizando a coluna HisTrap™ High Performance (Cytiva™) em aparelho ÄKTA Pure™ Protein Purification System (Cytiva™). No cromatograma da purificação foi possível observar discreta distorção na curva de detecção de UV durante a passagem das frações 3 a 5 (Figura 35B). Nas

frações 3 e 4 foram eluídos contaminantes, que se ligaram fracamente à coluna. Na fração 5 foi eluída a proteína de interesse. As amostras obtidas após a eluição foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 35A).

A fração purificada de proteína E₂ (1,8mL) foi quantificado obtendo-se 170ng/μL. O rendimento final da produção foi de 306μg de proteína, obtidos a partir de 25mL de sobrenadante das culturas, 12μg/mL de cultivo.

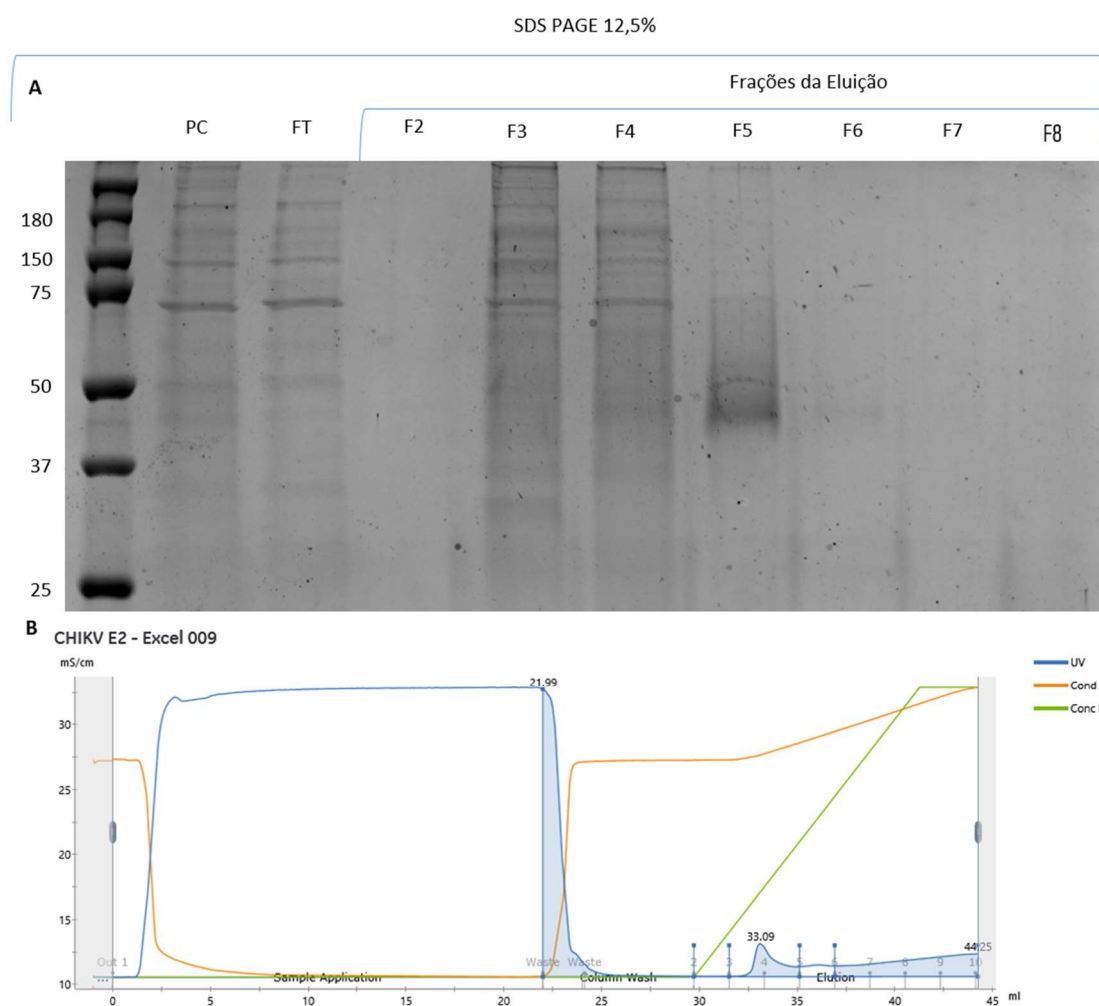


Figura 35 - Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel da proteína E₂ de CHIKV expressa de forma estável utilizando o pcDNA 3.1 sob pressão seletiva com G418. (A) SDS-PAGE das frações eluídas após a purificação da proteína E₂. PC: Amostra pré coluna – Sobrenadante de EXPI293 coletado após a recuperação das culturas selecionadas com G418 e repicadas. FT: Flow through - Fração que não se ligou à coluna de afinidade. F2-F8: Frações eluídas da coluna utilizando tampão com 500mM de imidazol. **(B)** Cromatograma da purificação.

6. DISCUSSÃO

As arboviroses são doenças de relevância mundial, infectam mais de 390 milhões de indivíduos anualmente e podem variar de condições assintomáticas a potencialmente fatais, como febres hemorrágicas e encefalite. No Brasil, surtos anuais são registrados durante o período chuvoso. Somente no ano de 2024, já foram registrados mais de 530 mil casos prováveis dessas doenças até o dia 15 de fevereiro, de acordo com boletim emitido pelo ministério da saúde. O diagnóstico precoce e preciso contribui para a diminuição da morbidade e mortalidade, porque permite a adoção de medidas específicas para o tratamento de cada uma delas. A partir do diagnóstico também é possível diminuir a subnotificação e implementar medidas de controle.

O isolamento viral com identificação de sorotipo ou a amplificação do material genético do vírus presente em amostras, são os exames “padrão-ouro” para o diagnóstico dessas doenças. Esses testes, entretanto, demandam grandes investimentos, estrutura laboratorial avançada e conhecimento técnico, o que dificulta sua realização.

O diagnóstico sorológico é mais acessível e demanda uma menor estrutura, por isso é o mais realizado no SUS. No Brasil diversos testes estão disponíveis. Para Dengue, esses testes não são capazes de diferenciar os sorotipos e para o vírus Chikungunya, apenas um teste emprega tecnologia nacional: O Kit TR DPP® CHIKUNGUNYA IgM/IgG - Bio-Manguinhos (<https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351333752201832/?nomeProduto>).

Com os casos de arboviroses aumentando anualmente e a disseminação das doenças pelo globo, aumenta também a necessidade do desenvolvimento de testes nacionais. Eles conferem ao Brasil uma independência da importação de tecnologia e insumos, e favorecem o diagnóstico dessas doenças. Além disso, otimizações, como a diminuição de custos, capacidade de diferenciação de sorotipos e melhores índices de sensibilidade e especificidade podem ser almejadas. Ao utilizar insumos como proteínas recombinantes produzidas em células humanas, espera-se reproduzir os padrões de glicosilação presentes nas proteínas dos vírus durante a infecção, o que pode contribuir para essas otimizações.

O presente trabalho teve como objetivo expressar e purificar proteínas recombinantes de arbovírus em células de mamífero para serem utilizadas no desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico. Foram avaliadas diferentes plataformas aplicadas a essa expressão e a utilização de pelo menos uma dessas proteínas em ELISA para diagnóstico. A proteína E dos 4 sorotipos do vírus da Dengue foi expressa de forma transiente e estável em diferentes plataformas e purificada por cromatografia líquida de afinidade. A proteína E2 de CHIKV também foi expressa, de forma transiente e estável, purificada e utilizada para a detecção de anticorpos do tipo IgM e IgG anti CHIKV em ELISA.

A construção das sequências dos genes propôs otimizações que favorecessem a expressão. A adição de sequência Kosak favoreceu o reconhecimento e interação do RNAm com o ribossomo, aumentando a tradução gênica. Demandas posteriores, durante o processo de purificação das proteínas, também foram consideradas. A secreção proteica era fundamental, permitindo que as proteínas fossem purificadas diretamente do sobrenadante das células. A remoção dos domínios transmembrana favoreceu a solubilidade dessas proteínas e o peptídeo sinal tPA (do gene do ativador de plasminogênio tecidual humano) permitiu uma sinalização intracelular para a secreção no sobrenadante. A cauda de histidina possibilitou a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel.

Diversas plataformas estão disponíveis para modificação genética de células de mamífero com os genes de interesse. A estratégia mais simples foi realizar a transfecção transiente do vetor contendo o gene de interesse. Para isso foram utilizadas nanopartículas lipídicas, como *Lipofectamine™ 3000* e *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher). Essa estratégia, apesar de eficiente para a expressão de algumas proteínas, exige maiores custos e aumenta a variabilidade do processo, exigindo novas transfecções a cada lote de produção e dificultando o escalonamento.

A geração de linhagens estáveis favorece o escalonamento e a reprodutibilidade dos lotes e diminui os custos. Para isso, foram avaliadas duas estratégias: expressão estável a partir da seleção de culturas transfectadas e utilização de vetor lentiviral para a transdução das células alvo.

A primeira delas consistiu na seleção de pools de células capazes de expressar estavelmente o gene das proteínas de interesse após a transfecção, quando submetidas a pressão seletiva com antibiótico. O plasmídeo pcDNA 3.1(+) foi clonado com os genes de interesse e utilizado como vetor nas transfecções transientes. Esse plasmídeo apresenta em sua sequência o gene de resistência a aminoglicosídeos sob regulação do promotor SV40. Após a transfecção foi possível selecionar as culturas utilizando concentrações conhecidas de G418 (Geneticina) e capazes de matar linhagens não transfectadas. Os sobrenadantes das culturas foram avaliados por SDS-PAGE e Western blot após se recuperarem da seleção. As proteínas do sorotipo 4 do vírus da Dengue e E2 do vírus Chikungunya continuaram a ser expressas pelo pool de células mesmo após sucessivas passagens na presença de droga. Isso sugere uma estabilização da expressão, mesmo após os repiques, enquanto se mantém a pressão seletiva.

Após a recuperação, a cultura de células expressando a proteína E2 de CHIKV foi subcultivada em duas condições: continuando a manter a pressão seletiva com G418 e retirando o antibiótico de seleção. Em ensaios de Western Blot observou-se que a cultura mantida sem o antibiótico cessa ou diminui significativamente a expressão da proteína de interesse. Isso indica que a manutenção da pressão seletiva é indispensável para a continuidade da expressão.

Os rendimentos obtidos após a purificação das proteínas desses sobrenadantes foram baixos, quando comparados aos dados já obtidos em outros trabalhos (ALVIM et al., 2022). Otimizações ainda podem ser realizadas para melhorar o protocolo, como utilização de clones. Essa estratégia, por induzir uma recombinação não homóloga dos genes no genoma da célula, é de difícil reprodução.

Outra estratégia utilizada foi a transdução das células por vetor lentiviral. Partículas virais foram montadas por meio da co-transfecção de culturas com três plasmídeos e os sobrenadantes obtidos após a transfecção eram utilizadas para transduzir uma nova cultura de células. Nessa estratégia, concentração prévia do sobrenadante lentiviral e a realização de sucessivas transduções de uma mesma cultura foram associadas ao aumento da expressão dos genes de

interesse. Ambas as alterações estão relacionadas a uma maior taxa de integração do transgene à célula hospedeira. A variabilidade entre os diferentes sorotipos do vírus da Dengue era esperada, em função das diferenças entre as sequências e esse fator dificulta a expressão das 4 proteínas simultaneamente.

Os rendimentos obtidos após a purificação das proteínas desses sobrenadantes, mesmo após as modificações, também foram baixos quando comparados a dados obtidos em outros trabalhos (GODECKE, HAUSER & WIRTH, 2018). Otimizações ainda podem ser realizadas, como a utilização de sequências com otimização de códons e de clones com melhores níveis de expressão. Essa estratégia demanda mecanismos mais complexos e mais etapas de manipulação das culturas.

Em ambas as estratégias, procedeu-se a seleção de pool de células. Como ambos os sistemas induzem a integração do transgene em região aleatória, é esperada a geração células com diferentes capacidades de expressão em uma mesma cultura. Nesse trabalho não foi possível isolar clones para avaliação da variabilidade entre as diferentes células, mas essa perspectiva pode permitir aumentar o rendimento final da purificação após o cultivo quando se utiliza um clone de alta expressão.

As sequências que codificam a expressão dos genes de interesse utilizadas para a montagem do vetor viral não foram códon otimizadas para a expressão em células de mamífero. A ausência dessa otimização também pode estar associada ao baixo rendimento observado. Apesar de os vírus evoluírem para se adaptar aos seus hospedeiros, e serem capazes de expressar proteínas de forma eficiente, o ciclo de transmissão dos arbovírus, como Dengue e Chikungunya requer a infecção de dois hospedeiros: um artrópode e um humano. Essa característica faz com que as sequências não estejam completamente otimizadas nem para o mosquito, nem para o humano. Experimentos para montagem de novas partículas virais contendo as sequências com otimização de códons já está sendo realizados.

Duas linhagens celulares foram utilizadas para a expressão das proteínas de interesse, as células HEK293T (Células embrionárias de rim humano) e as células EXPI293 (Células derivadas de HEK293, comercialmente

otimizadas). As duas linhagens foram capazes de expressar as proteínas de interesse, entretanto, optou-se pelas células EXPI293 para a continuidade do trabalho. A linhagem EXPI293 também deriva de células humanas e faz parte de um sistema desenvolvido para produção de proteínas recombinantes com alto rendimento(<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-expression/mammalian-protein-expression/transient-mammalian-protein-expression/exp293-expression-system.html>). Essas células crescem em suspensão atingindo altas densidades em um meio de expressão quimicamente definido e livre de soro fetal bovino, o que facilita análises por western blot e purificação por cromatografia líquida de afinidade. Utilizando essa linhagem celular foi possível expressar e purificar todas as proteínas de interesse transduzidas sucessivas vezes por vetor viral e/ou transfectadas com pcDNA 3.1 e selecionadas com G418.

Todas as proteínas expressas em células EXPI293 apresentaram massa molecular em SDS-PAGE e Western-Blot maior do que o previsto com base nas suas sequências de aminoácidos. Essa discrepância está provavelmente relacionada com a presença das modificações pós traducionais realizadas por essas células, como glicosilações. Experimentos posteriores com digestão dessas proteínas por glicosidases, como a PNGase podem confirmar a presença dessas glicosilações.

É importante ressaltar que, de acordo com o fabricante, as otimizações realizadas na linhagem EXPI293 favorecem a expressão transiente de proteínas, por isso ensaios posteriores serão realizados em outras linhagens celulares, que podem favorecer expressão estável, como as células CHO (Células de ovário de hamster chinês). Outras plataformas eucariontes de expressão, como *Pichia Pastoris* e Baculovírus também podem ser avaliadas quanto ao seu potencial para expressão dessas proteínas. Os padrões de glicosilação, entretanto, variam de acordo com cada organismo e isso pode interferir na antigenicidade das proteínas produzidas, uma vez que esses vírus originalmente infectam e produzem suas proteínas antigênicas em células humanas.

Para a purificação, duas colunas de afinidade de níquel pre-empacotadas com Ni sepharose foram utilizadas. A primeira delas *HisTrap excel* (GE Healthcare Life Sciences) é uma coluna projetada para captura e purificação

de proteínas marcadas com histidina secretadas em sobrenadantes de cultura de células eucarióticas por cromatografia de afinidade. Essa coluna, entretanto, tem um custo maior e uma disponibilidade de aquisição limitada. A coluna HisTrap™ High Performance (Cytiva™), apresenta menores custos e é amplamente utilizada para a purificação de proteínas obtidas a partir de diversas plataformas. O presente trabalho demonstrou sua capacidade de purificar proteínas obtidas também a partir da secreção por células de mamífero no sobrenadante. O protocolo ainda pode ser otimizado para diminuir a quantidade de contaminantes presentes nas frações purificadas, aumentando a etapa de lavagem, adicionando imidazol ao tampão ligação (Tampão A) e aumentando o volume de eluição.

Dentre as proteínas produzidas, a proteína E2 de CHIKV foi a que apresentou melhor rendimento após a purificação e por isso foi avaliada quanto a sua antigenicidade em ensaios de ELISA indireto IgM/IgG. Para comparação dos resultados obtidos, a mesma proteína foi expressa em *Escherichia coli* BL21. Os resultados do ensaio de ELISA são comparáveis entre as duas proteínas para a detecção de anticorpos do tipo IgG em sensibilidade e especificidade. Todavia as absorbâncias obtidas a partir da utilização de proteínas eucariontes são maiores para amostras positivas, sugerindo um teste melhor, que favorece a diferenciação de entre amostras positivas e negativas tanto para anticorpos do tipo IgM quanto do tipo IgG. A utilização da proteína produzida em células procariontes para detecção de anticorpos do tipo IgM, entretanto, ainda pode ser considerada mais vantajosa por se tratar de um sistema de expressão mais rápido e com custos menores. Para anticorpos do tipo IgM o ELISA utilizando a proteína produzida em células EXPI293 apresentou resultados melhores, com sensibilidade superior a 80%. Esses dados provavelmente associam-se ao fato de que anticorpos do tipo IgM se ligam de forma eficiente a carboidratos e tendem a interagir melhor com proteínas glicosiladas (Keyt *et al.* 2020). Com isso, a utilização das proteínas expressas em células de mamífero é capaz de melhorar a sensibilidade de testes para detecção de anticorpos do tipo IgM contra CHIKV.

Os dois lotes da proteína E2 produzida em células EXPI293 e avaliados quanto ao desempenho em ELISA foram purificados em colunas diferentes. A

coluna *HisTrap excel* (GE *Healthcare Life Sciences*) foi utilizada na purificação que deu origem ao primeiro lote, utilizado nos primeiros experimentos de ELISA (Figuras 31 e 32). Nessa purificação foi obtido um lote com menor número de contaminantes. No segundo lote a purificação foi realizada utilizando a coluna *HisTrap™ High Performance* (Cytiva™). Esse lote de proteínas foi utilizado para os experimentos de ELISA comparativos com a E₂ produzida em *E.coli* (Figuras 36 e 37). Nesse lote o pool das frações obtidas após a purificação apresentou uma maior quantidade de proteínas contaminantes. Essa diferença pode estar associada à variação do desempenho entre os testes, com um aumento do *background* no segundo ensaio, que levou a um aumento do *cut-off*. Otimizações, como uma maior duração da etapa de lavagem e adição de maiores concentrações de Imidazol ao tapão de lavagem, podem ser realizadas na purificação com a *HisTrap™ High Performance* (Cytiva™) para diminuir esses contaminantes, já que a sua utilização é economicamente mais vantajosa.

Algumas modificações durante o processo também podem levar a resultados ainda melhores no ELISA. Otimização no processo de produção e purificação da proteína podem diminuir o background aumentando a capacidade de diferenciação do teste. Nova titulação da proteína e variação em parâmetros como diluição do soro e tempos de incubação também podem melhorar o teste. A ampliação da soroteca permite uma melhor validação dos ensaios.

Testes de point of care baseados em imunocromatografia de fluxo lateral serão prototipados utilizando a proteína expressa em células de mamífero conjugada com o ouro coloidal. Para isso é necessária a obtenção de melhores rendimentos após a purificação.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a expressão e purificação da proteína de Envelope dos 4 sorotipos do vírus da Dengue em células HEK293T e EXPI293 de forma transiente e estável. Demonstrou também que dois sistemas podem ser aplicados à expressão estável: a seleção de pools de células capazes de expressar estavelmente o gene das proteínas de interesse após a transfecção, quando submetidas a pressão seletiva com antibiótico e a transdução por vetor lentiviral.

A proteína E2 do vírus Chikungunya também foi expressa de forma transiente e estável em células EXPI293. Essa proteína foi avaliada quanto a sua antigenicidade em ELISA e demonstrou-se eficiente para a detecção de anticorpos tanto do tipo IgM quanto do tipo IgG. Com desempenho melhor que a proteína produzida em células procariontes para IgM, sugerindo grande potencial para a sua aplicação em testes comerciais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, J.M., HOERMANN, B., SCHLIMBACH, T. et al. "Changes in global translation elongation or initiation rates shape the proteome via the Kozak sequence." **Scientific Reports**, 8, 4018 (2018).

AKAHATA, W., YANG, ZY., ANDERSEN, H. et al. "A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection." **Nature Medicine**, 16, 334–338 (2010).

ASSENBERG R, WAN PT, GEISSE S, MAYR LM. "Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research." **Current Opinion in Structural Biology**, 23(3), 393-402 (2013).

BAGNO, FF. "Geração de proteínas recombinantes e aplicação em testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-Chikungunya, Zika e SARS-CoV-2." **Tese de doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia** do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas. Belo Horizonte, 2021.

BANEYX F. "Recombinant protein expression in Escherichia coli." **Current Opinion in Biotechnology**, 10(5), 411-21 (1999).

BARNES LM, BENTLEY CM, DICKSON AJ. "Characterization of the stability of recombinant protein production in the GS-NS0 expression system." **Biotechnology and Bioengineering**, 73(4), 261-70 (2001).

BELTRAMELLO M, WILLIAMS KL, SIMMONS CP, MACAGNO A, SIMONELLI L, QUYEN NT, SUKUPOLVI-PETTY S, NAVARRO-SANCHEZ E, YOUNG PR, DE SILVA AM, REY FA, VARANI L, WHITEHEAD SS, DIAMOND MS, HARRIS E, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. "The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity." **Cell Host & Microbe**, 8(3), 271-83 (2010).

BORGHIERINI G, POUBEAU P, JOSSAUME A, GOUIX A, COTTE L, MICHAULT A, ARVIN-BEROD C, PAGANIN F. "Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island." **Clinical Infectious Diseases**, 47(4), 469-75 (2008).

BRONDYK WH. "Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein." **Methods in Enzymology**, 463, 131-47 (2009).

CARDONA-OSPINA JA, DIAZ-QUIJANO FA, RODRÍGUEZ-MORALES AJ. "Burden of chikungunya in Latin American countries: estimates of disability-adjusted life-years (DALY) lost in the 2014 epidemic." **International Journal of Infectious Diseases**, 38, 60-1 (2015).

CARDOSO-LIMA R, FILHO JFSD, DE ARAUJO DORNELES ML, GASPAR RS, SOUZA PFN, COSTA DOS SANTOS C, SANTORO ROSA D, SANTOS-OLIVEIRA R, ALENCAR LMR. "Nanomechanical and Vibrational Signature of Chikungunya Viral Particles." **Viruses**, 14(12), 2821 (2022).

CAREY DE. "Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity?" **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, 26(3), 243-62 (1971).

CASTRO, J.T., AZEVEDO, P., FUMAGALLI, M.J. et al. "Promotion of neutralizing antibody-independent immunity to wild-type and SARS-CoV-2 variants of concern using an RBD-Nucleocapsid fusion protein." **Nature Communications**, 13, 4831 (2022).

CHEEKS MC, EDWARDS AD, ARNOT CJ, SLATER NK. "Gene transfection of HEK cells on supermacroporous polyacrylamide monoliths: a comparison of transient and stable recombinant protein expression in perfusion culture." **New Biotechnology**, 26(6), 289-99 (2009).

COLLER BA, CLEMENTS DE, BETT AJ, SAGAR SL, TER MEULEN JH. "The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease." **Vaccine**, 29(42), 7267-75 (2011).

CONDREAY JP, WITHERSPOON SM, CLAY WC, KOST TA. "Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96(1), 127-32 (1999).

CONSTANT LEC, RAJSFUS BF, CARNEIRO PH, SISNANDE T, MOHANA-BORGES R, ALLONSO D. "Overview on Chikungunya Virus Infection: From Epidemiology to State-of-the-Art Experimental Models." **Frontiers in Microbiology**, 12, 744164 (2021).

COSTA LB, BARRETO FKA, BARRETO MCA, SANTOS THPD, ANDRADE MMO, FARIAS LABG, FREITAS ARR, MARTINEZ MJ, CAVALCANTI LPG. "Epidemiology and Economic Burden of Chikungunya: A Systematic Literature Review." **Tropical Medicine and Infectious Disease**, 8(6), 301 (2023).

CUNHA RVD, TRINTA KS. "Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review." **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 112(8), 523-531 (2017).

CUZZUBBO AJENDY TP, NISALAK A, KALAYANAROOJ S, VAUGHN DW, OGATA SA, CLEMENTS DE, DEVINE PL. "Use of Recombinant Envelope Proteins for Serological Diagnosis of Dengue Virus Infection in an Immunochromatographic Assay." **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 8(6), 1150-1155 (2001).

DA SILVA NETO, SR, TABOSA DE OLIVEIRA, T., TEIXIERA, IV ET AL. "Dados de registro de arboviroses - Dengue e Chikungunya, Brasil, 2013–2020." **Scientific Data**, 9, 198 (2022).

DAVID A. MULLER, ALEXANDRA CI DEPELSENAIRE, PAUL R. YOUNG. "Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection." **The Journal of Infectious Diseases**, Volume 215, Issue suppl_2, S89–S95 (2017).

DE LIMA CAVALCANTI TYV, PEREIRA MR, DE PAULA SO, FRANCA RFO. "A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development." **Viruses**, 14(5), 969 (2022).

DEJNIRATTAISAI W, JUMNAINSONG A, ONSIRISAKUL N, FITTON P, VASANAWATHANA S, LIMPITIKUL W, et al. "Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans." **Science**, 328(5979), 745–748 (2010).

DEUBEL V, LAILLE M, HUGNOT JP, CHUNGUE E, GUESDON JL, DROUET MT, BASSOT S, CHEVRIER D. "Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood." **Journal of Virological Methods**, 30(1), 41-54 (1990).

DIAMOND MS. "Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses." **Immunology and Cell Biology**, 81(3), 196-206 (2003).

FIGUEIREDO LTM. "Patogenia das infecções pelos vírus do dengue." *Medicina, Ribeirão Preto*, 32, 15-20 (1999).

GEISSE S, FUX C. "Recombinant protein production by transient gene transfer into Mammalian cells." **Methods in Enzymology**, 463, 223-38 (2009).

GIRARD M, NELSON CB, PICOT V, GUBLER DJ. "Arboviruses: A global public health threat." **Vaccine**, 38(24), 3989-3994 (2020).

GN MALAVIGE, S FERNANDO, DJ FERNANDO, SL SENEVIRATNE. "Dengue Viral Infecções." **Postgraduate Medical Journal**, 80(948), 588–601 (2004).

GÖDECKE N, HAUSER H, WIRTH D. "Stable Expression by Lentiviral Transduction of Cells." **Methods in Molecular Biology**, 1850, 43-55 (2018).

GOH LY, HOBSON-PETERS J, PROW NA, GARDNER J, BIELEFELDT-OHMANN H, PYKE AT, SUHRBIER A, HALL RA. "Neutralizing monoclonal antibodies to the E2 protein of chikungunya virus protects against disease in a mouse model." **Clinical Immunology**, 149(3), 487-97 (2013).

GOULD E A, de LAMBALLERIE X, ZANOTTO P M A, HOLMES E C. Origins, evolution, and vector/ host coadaptations within the Genus Flavivirus. **Advances in Virus Research**, Volume 59, 277-314 (2003).

GOULD E, PETTERSSON J, HIGGS S, CHARREL R, LAMBALLERIE X. Emerging arboviruses: Why today?. **One Health**, 4, 1-13 (2017).

GRAY D. Overview of protein expression by mammalian cells. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 5(1), Unit5.9 (2001).

GUZMAN MG, HALSTEAD SB, ARTSOB H, BUCHY P, FARRAR J, GUBLER DJ, HUNSPERGER E, KROEGER A, MARGOLIS HS, MARTÍNEZ E, NATHAN MB, PELEGRINO JL, SIMMONS C, YOKSAN S, PEELING RW. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, 8(12 Suppl), S7-16 (2010).

HACKER DL, BALASUBRAMANIAN S. Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools. **Current Opinion in Structural Biology**, 38, 129-36 (2016).

HASAN S, JAMDAR SF, ALALOWI M, AL AGEEL AL BEAIJI SM. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, 6(1), 1-6 (2016).

HUANG YS, HIGGS S, VANLANDINGHAM DL. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. **Current Opinion in Virology**, 34, 104-109 (2019).

KALLÁS EG, CINTRA MAT, MOREIRA JA, PATIÑO EG, BRAGA PE, TENÓRIO JCV, INFANTE V, PALACIOS R, DE LACERDA MVG, BATISTA PEREIRA D, DA FONSECA AJ, GURGEL RQ, COELHO IC, FONTES CJF, MARQUES ETA, ROMERO GAS, TEIXEIRA MM, SIQUEIRA AM, BARRAL AMP, BOAVENTURA VS, RAMOS F, ELIAS JÚNIOR E, CASSIO DE MORAES J, COVAS DT, KALIL J, PRECIOSO AR, WHITEHEAD SS, ESTEVES-JARAMILLO A, SHEKAR T, LEE JJ, MACEY J, KELNER SG, COLLIER BG, BOULOS FC, NOGUEIRA ML. Live, Attenuated, Tetravalent Butantan-Dengue Vaccine in Children and Adults. **New England Journal of Medicine**, 390(5), 397-408 (2024).

KAMHI, E., JOO, E. J., DORDICK, J. S., & LINHARDT, R. J. Glycosaminoglycans in infectious disease. **Biological Reviews**, 88(4), 928-943 (2013).

KATZELNICK LC, GRESH L, HALLORAN ME, MERCADO JC, KUAN G, GORDON A, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, 358(6365), 929–932 (2017).

KEYT BA, BALIGA R, SINCLAIR AM, CARROLL SF, PETERSON MS. Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. **Antibodies**, 9(4), 53 (2020).

KRAEMER, MUG, REINER, RC, BRADY, OJ et al. Disseminação passada e futura dos vetores de arbovírus Aedes aegypti e Aedes albopictus. **Nature Microbiology**, 4, 854–863 (2019).

KU SC, TOH PC, LEE YY, CHUSAINOW J, YAP MG, CHAO SH. Regulation of XBP-1 signaling during transient and stable recombinant protein production in CHO cells. **Biotechnology Progress**, 26(2), 517-26 (2010).

KUMAR M, SUDEEP AB, ARANKALLE VA. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus. **Vaccine**, 30(43), 6142-9 (2012).

LIU, JIAN, and SUZANNE C. THORP. Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. **Medicinal Research Reviews**, 22(1), 1-25 (2002).

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**, 10(12 Suppl), S98-S109 (2004).

MADEWELL ZJ. Arboviruses and Their Vectors. **Southern Medical Journal**, 113(10), 520-523 (2020).

MAGALHAES T, CHALEGRE KDM, BRAGA C, FOY BD. The Endless Challenges of Arboviral Diseases in Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, 5(2), 75 (2020).

MARIMOUTOU C, FERRARO J, JAVELLE E, DEPARIS X, SIMON F. Chikungunya infection: self-reported rheumatic morbidity and impaired quality of life persist 6 years later. **Clinical Microbiology and Infection**, 21(7), 688-93 (2015).

METZ, SW., THOMAS, A., WHITE, L. et al. Dengue virus-like particles mimic the antigenic properties of the infectious dengue virus envelope. **Virology Journal**, 15, 60 (2018).

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, 427, 313–319 (2004).

MOREIRA, J., PEIXOTO, T. M., SIQUEIRA, A. M., & LAMAS, C. C. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, 23(5), 296-305 (2017).

MURUGESAN A, MANOHARAN M. Dengue Virus. **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**, 281–359 (2020).

MUSTAFA MS, RASOTGI V, JAIN S, GUPTA V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal of Armed Forces India**, 71(1), 67-70 (2015).

NARAYAN R, TRIPATHI S. Intrinsic ADE: The Dark Side of Antibody Dependent Enhancement During Dengue Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10, 580096 (2020).

NANAWARE N, BANERJEE A, MULLICK BAGCHI S, BAGCHI P, MUKHERJEE A. Dengue Virus Infection: A Tale of Viral Exploitations and Host Responses. **Viruses**, 13(10), 1967 (2021).

OH T, BAJWA A, JIA G, PARK F. Lentiviral vector design using alternative RNA export elements. **Retrovirology**, 4, 38 (2007).

OLIVEIRA, SB. Construção e avaliação do potencial protetor, em modelo murinho, de diferentes construções do vaccinia virus Ankara modificado (MVA) expressando a proteína E de Dengue Vírus sorotipos 1, 2 e 4. **Tese de doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia** do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas. Belo Horizonte (2019).

OSCAR JÚNIOR, A.C., DE ASSIS MENDONÇA, F. Climate change and risk of arboviral diseases in the state of Rio de Janeiro (Brazil). **Theoretical and Applied Climatology**, 145, 731–745 (2021).

PALANICHAMY KALA M, ST JOHN AL, RATHORE APS. Dengue: Update on Clinically Relevant Therapeutic Strategies and Vaccines. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, 15(2), 27-52 (2023).

PAVLAKIS GN, FELBER BK. Regulation of expression of human immunodeficiency virus. **New Biology**, 2(1), 20-31 (1990).

PETERSEN, L. R., & POWERS, A. M. Chikungunya: epidemiology. **F1000Research**, 5, F1000 Faculty Rev-82.

PHUC V. PHAM, Medical Biotechnology: Techniques and Applications. **Omics Technologies and Bio-Engineering**, Academic Press, 2018, Pages 449-469.

PITCHER TJ, SARATHY VV, MATSUI K, GROMOWSKI GD, HUANG CY, BARRETT ADT. "Functional analysis of dengue virus (DENV) type 2 envelope protein domain 3 type-specific and DENV complex-reactive critical epitope residues." **Journal of General Virology**, 96(Pt 2), 288-293 (2015).

QUEIROZ, CO. Expressão da proteína E2 recombinante do vírus Chikungunya em células eucariotas para utilização em plataformas diagnósticas. **Dissertação de mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia** do Instituto

de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas.Belo Horizonte, (2023).

QUINAN, BR. Construção, Avaliação da Imunogenicidade e Potencial Protetor, em Modelo Murino, de Diferentes Construções do Vaccinia virus Ankara Modificado (MVA) Expressando a Proteína E de Dengue virus Sorotipo 3. **Tese de doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia** do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas. Belo Horizonte (2014).

REIS EVS, DAMAS BM, MENDONÇA DC, ABRAHÃO JS, BONJARDIM CA. "In-Depth Characterization of the Chikungunya Virus Replication Cycle." **Journal of Virology**, 96(3), e0173221 (2022).

RENATA G.F. ALVIM et al. "From a recombinant key antigen to an accurate, affordable serological test: Lessons learnt from COVID-19 for future pandemics." **Biochemical Engineering Journal**, Volume 186, 108537 (2022).

RICO-HESSE R. "Microevolution and virulence of dengue viruses." **Advances in Virus Research**, 59, 315-341 (2003).

ROBINSON MC. "An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features." **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 49(1), 28-32 (1955).

ROSANO GL, CECCARELLI EA. "Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges." **Frontiers in Microbiology**, 5, 172 (2014).

ROSS RW. "The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic." **Journal of Hygiene (London)**, 54(2), 177-191 (1956).

ROY SK, BHATTACHARJEE S. "Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology." **Canadian Journal of Microbiology**, 67(10), 687-702 (2021).

SAHDEV S, KHATTAR SK, SAINI KS. "Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies." **Molecular and Cellular Biochemistry**, 307(1-2), 249-264 (2008).

SANBER K et al. "Construção de linhas celulares de empacotamento estáveis para produção clínica de vetores lentivirais." **Scientific Reports**, 5, 9021 (2015).

Sarah ZERBS et al. "Bacterial Systems for Production of Heterologous Proteins." **Methods in Enzymology**, Volume 463, 149-168 (2009).

SCHMIDT, FR. "Sistemas de expressão recombinantes na indústria farmacêutica." **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65, 363-372 (2004).

SCHWARTZ, O., ALBERT, M. "Biology and pathogenesis of chikungunya virus." **Nature Reviews Microbiology**, 8, 491–500 (2010).

SEGATO-VENDRAMETO CZ et al. "Chikungunya Virus and Its Envelope Protein E2 Induce Hyperalgesia in Mice: Inhibition by Anti-E2 Monoclonal Antibodies and by Targeting TRPV1." **Cells**, 12, 556 (2023).

SHEPARD DS, UNDURRAGA EA, HALASA YA, STANAWAY JD. "The global economic burden of dengue: a systematic analysis." **Lancet Infectious Diseases**, 16(8), 935-941 (2016).

SILVA JPDC, CUNHA MDP, POUR SZ, HERING VR, NETO DFL, ZANOTTO PMA. "Chikungunya Virus E2 Structural Protein B-Cell Epitopes Analysis." **Viruses**, 14(8), 1839 (2022).

SILVA LA, DERMODY TS. "Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies." **Journal of Clinical Investigation**, 127(3), 737-749 (2017).

SILVA, LJ., and ANGERAMI, RN. "Arboviroses no Brasil contemporâneo." In: *Viroses emergentes no Brasil* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 37-56. **Temas em Saúde collection**. ISBN 978-85-7541-381-4.

Simo FBN, Burt FJ, Makoah NA. "Chikungunya Virus Diagnosis: A Review of Current Antigen Detection Methods." **Tropical Medicine and Infectious Disease**, 8(7), 365 (2023).

SOARES CR et al. "Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the lambdaPL promoter: use of HPLC for product quantification." **Protein Engineering**, 16, 1131–1138 (2003).

SOLIGNAT M, GAY B, HIGGS S, BRIANT L, DEVAUX C. "Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus." **Virology**, 393(2), 183-197 (2009).

SORENSEN HP, MORTENSEN KK. "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*." **Journal of Biotechnology**, 115, 113-128 (2005).

SOUZA CDF, GOIS-SANTOS VT, CORREIA DS, MARTINS-FILHO PR, SANTOS VS. "The need to strengthen Primary Health Care in Brazil in the context of the COVID-19 pandemic." **Brazilian Oral Research**, 34, e047 (2020).

STRAUSS JH, STRAUSS EG. "The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution." **Microbiol Rev**, 58(3), 491-562 (1994).

SUHRBIER A. "Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions." **Nat Rev Rheumatol**, 15, 597–611 (2019).

TANDON N, THAKKAR KN, LAGORY EL, LIU Y, GIACCIA AJ. "Generation of Stable Expression Mammalian Cell Lines Using Lentivirus." **Bio Protoc**, 8(21), e3073 (2018).

TEO A, TAN HD, LOY T, CHIA PY, CHUA CLL. "Understanding antibody-dependent enhancement in dengue: Are afucosylated IgG1s a concern?" **PLoS Pathog**, 19(3), e1011223 (2023).

THIBERVILLE SD, MOYEN N, DUPUIS-MAGUIRAGA L, NOUGAIREDE A, GOULD EA, ROQUES P, DE LAMBALLERIE X. "Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy." **Antiviral Res**, 99(3), 345-370 (2013).

TOMÁS HA, RODRIGUES AF, CARRONDO MJT, COROADINHA AS. "LentiPro26: novel stable cell lines for constitutive lentiviral vector production." **Sci Rep**, 8(1), 5271 (2018).

VARGHESE J, DE SILVA I, MILLAR DS. "Latest Advances in Arbovirus Diagnostics." **Microorganisms**, 11(5), 1159 (2023).

VIGLIETTA M, BELLONE R, BLISNICK AA, FAILLOUX AB. "Vector Specificity of Arbovirus Transmission." **Front Microbiol**, 12, 773211 (2021).

VOSS J, VANEY MC, DUQUERROY S, et al. "Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography." **Nature**, 468, 709–712 (2010).

WANG JY, SONG WT, LI Y, et al. "Improved expression of secretory and trimeric proteins in mammalian cells via the introduction of a new trimer motif and a mutant of the tPA signal sequence." **Appl Microbiol Biotechnol**, 91, 731–740 (2011).

WEAVER SC, BARRETT AD. "Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease." **Nature Reviews Microbiology**, 2(10), 789-801 (2004).

WEBER C, BERBERICH E, VON RHEIN C, HENß L, HILDT E, SCHNIERLE BS. "Identificação de Determinantes Funcionais na Proteína E2 do Vírus Chikungunya." **PLoS Negl Trop Dis**, 11(1), e0005318 (2017).

WILDER-SMITH A. "TAK-003 dengue vaccine as a new tool to mitigate dengue in countries with a high disease burden." **Lancet Glob Health**, 12(2), e179-e180 (2024).

WU SJ, GROUARD-VOGEL G, SUN W, et al. "Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection." **Nat Med**, 6, 816–820 (2000).

WURM F, BERNARD A. "Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production." **Curr Opin Biotechnol**, 10(2), 156-9 (1999).

YAMANAKA A, IMAD HA, PHUMRATANAPRAPIN W, et al. "Antibody-dependent enhancement representing in vitro infective progeny virus titer correlates with the viremia level in dengue patients." **Sci Rep**, 11, 12354 (2021).

ANEXO A- CARTA EMITIDA PELA FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS-FUNED A RESPEITO DO USO DE AMOSTRAS HUMANAS NO PROJETO.



Participar do fortalecimento do Sistema Único de Saúde,
protegendo e promovendo a saúde

**INSTITUTO OCTÁVIO MAGALHÃES
DIVISÃO DE EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DE DOENÇAS
SERVIÇO DE VIROLOGIA E RIQUETSIOSES**

Eu, Glauco de Carvalho Pereira, chefe do Laboratório de Virologia e Riquetsioses da Fundação Ezequiel Dias – FUNED, autorizo a utilização de amostras de soro humano provenientes desta Instituição no âmbito da realização dos seguintes projetos nos dos quais temos colaboração formalizada nos termos dos respectivos editais e programas:

- 1) PROJETO: "DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS DIFERENCIAIS PARA ARBOVIROSES BRASILEIRAS BASEADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS CONSERVADOS/ NÃO CONSERVADOS NO PROTEOMA DOS DIFERENTES VÍRUS E NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES OBTIDAS EM SISTEMAS HETERÓLOGOS DE EXPRESSÃO". MODALIDADE: "EDITAL 007/2017 - PROGRAMA DE PESQUISA PARA O SUS - PPSUS" - PROCESSO N.: CBB- APQ-04295-17. COORDENADOR: PROF. FLAVIO G DA FONSECA
- 2) PROJETO: "DESENVOLVIMENTO DE TESTE SOROLÓGICO DIFERENCIAL PARA DENGUE, CHIKUNGUNYA ZIKA E FEBRE AMARELA - BIOSSENSORES BASEADOS EM NANOBASTÕES DE OURO". MODALIDADE: "EDITAL 001/2017 - DEMANDA UNIVERSAL". PROCESSO N.: CBB - APQ-03081-17. COORDENADOR: PROF. FLAVIO G DA FONSECA

As amostras serão utilizadas pelo Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - Professor Associado junto ao Depto. de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, CI número M3467468, Siape no. 1 519 530 - para estudos de vigilância epidemiológica e para a pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias de diagnósticos.

Atenciosamente,

Glauco Carvalho Pereira
Chefe do Serviço de Virologia e Riquetsioses
DECD-DIOM-FUNED-LACEN/MG
CRBio-04/rp44962/04-D /MASP: 1169906-3
14 de julho de 2018

ANEXO B- PARTE DO RELATÓRIO GERADO PELA VALIDAÇÃO EXTERNA DE PRODUTOS DO CT-VACINAS PELO LABORATÓRIO EM TECNOLOGIA DIAGNÓSTICA (FIOCRUZ, RJ) INCLUINDO O ELISA PARA CHIKV.



Perspectiva:

Como apresentado para o grupo IRR/UFMG, Bio-Manguinhos está dotado de infraestrutura física e grupo técnico com capacidade não só para desenvolver, como também produzir e registrar produtos da linha diagnóstica em sorologia, em especial, testes rápidos, como também testes moleculares.

Como discutido em reunião com a Diretoria de Bio-Manguinhos, quando da visita da **Profª. Dra. Ana Paula Fernandes** e do **Prof. Dr. Ricardo Gazzinelli**, deveremos avançar nas tratativas para encontrar as melhores alternativas para adequar e harmonizar um instrumento de parceria/cooperação tecnológica.


Edmilson D. da Silva
Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
Bio-Manguinhos | Fiocruz

Chikungunya – ELISA pesquisa de IgG				
Antígeno	Plataforma	Sensibilidade	Especificidade	Amostras
E2	Elisa	93% (72/67)*	94% (49/46)*	BioM

* 2 amostras indeterminadas

Chikungunya – ELISA pesquisa de IgG (ZIKA e Dengue)				
Antígeno	Plataforma	ZIKA	Dengue	Amostras
E2	Elisa	0% (8/0)	0% (7/0)*	BioM

* 2 amostras indeterminadas

Observação: As amostras indeterminadas não foram incluídas nos cálculos de sensibilidade e especificidade.

Considerações:

Com base nos resultados das avaliações, utilizando diferentes perfis de caracterização das amostras, foi possível constatar a elevada eficiência dos conjuntos de kits testados, indicando um potencial na sua utilização como ferramenta de diagnóstico.

Bio-Manguinhos/Fiocruz
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
Av. Brasil, 4.365, Pavilhão Rocha Lima, Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 21040-900
SAC: 08000 210310 - www.bio.fiocruz.br - facebook.com/BioFiocruz

ANEXO C- SOLUÇÕES E TAMPÕES

- **Cultivo em procarioto**

Meio de cultivo LB: Triptona 10g/L; Extrato de levedura 5g/L; NaCl 5g/L.

Meio de cultivo LB Ágar: Triptona 10g/L; Extrato de levedura 5g/L; NaCl 5g/L; Ágar 15g/L.

- **Gel de agarose**

TAE (Tris-Acetato-EDTA) 50X: Tris base 242 g/L; Ácido acético glacial (CH₃COOH) 5,7%; EDTA 0,5M (pH 8,0) 10%.

- **SDS-PAGE**

Tampão Tris-HCl 1,5mM - pH 8,8: Tris 182 g/L; SDS 4g/L.

Tampão Tris-HCl 0,5mM - pH6,8: Tris 60 g/L; SDS 4g/L.

Tampão de amostra de proteína 4X: Tris-HCl 200 mM pH 6,8; SDS 10%; Azul de bromofenol 0,05%; Glicerol 20%; β-mercaptoetanol 8%.

Tampão de corrida: Tris 0,25M; Glicina 1,9M; SDS 1%.

Azul de Coomassie: Azul de Coomassie 1g/L; Etanol 50%; Ácido acético 10%.

Solução descorante: Etanol 40%; Ácido acético 10%.

- **Western Blot**

Tampão de transferência: Tris 15,15g/L; Glicina 72g/L; Etanol 20%.

Ponceu: Ponceu 0,1%; Ácido acético 5%.

Solução de lavagem TBS-T - pH 7,5: TBS 1X (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM); Tween-20 0,1%.

Solução de bloqueio: Leite em pó 5% (p/v) em TTBS 1X.

- **Cromatografia em Akta**

Sobrenadante de Células Eucariontes:

Tampão de lavagem (Tampão A) – pH 7,4: NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 30 mM.

Tampão de eluição (Tampão B) – pH 7,4: NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 500 mM.

Cultivo em *E.coli*:

Tampão de lise – pH 7,4: Tris-HCl 20 mM; NaCl 100 mM; DTT 5 mM; Benzamidina 5 mM; PMSF 1mM

Tampão de lavagem (Tampão A) – pH 7,4: NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 500 mM; Imidazol 30 mM; Ureia de acordo com o teste de solubilidade

Tampão de eluição (Tampão B) – pH 7,4: • NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 500 mM; Imidazol 500 mM; 8M uréia

- **ELISA**

Etapa 1: Sensibilização – pH 9.6: Carbonato de sódio 15 mM; Bicarbonato de sódio 85 mM.

Etapa 2: Bloqueio – pH 7,4: Sacarose 10 %p/v; Cloreto de sódio 150 mM; Albumina bovina 1%p/v.

Etapa 3: Diluente de Amostra – pH 7,4: Fosfato de sódio dibásico anidro PA 100mM; Fosfato de potássio monobásico anidro 17mM; Cloreto de sódio 150mM; Cloreto de potássio PA 28mM Albumina bovina 1%; Sacarose 2%; D-manitol 1%; 0,1%v/v; Tween 80 0,05% v/v

Etapa 4: Tampão de lavagem 10X – pH 7,4: Fosfato de sódio dibásico anidro PA 100 mM; Fosfato de potássio monobásico anidro 18 mM; Cloreto de sódio 1500 mM; Cloreto de potássio PA 28mM; Proclin 0,1 %v/v; Tween 20 1 %v/v.

Etapa 5: Conjugado: anti-IgG humano Sigma (Ref.:A170, lote 154644) diluído em diluente de amostra 1:60.000; anti-IgM humano Sigma (Ref.:A0420, lote: 103923) diluído em diluente de amostra 1:40.000

Etapa 6: Substrato: TMB One Step Scienco.

Etapa 7: Solução de Parada: Ácido sulfúrico 0,5 M