



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ANTONIO FERNANDO DA PURIFICAÇÃO JÚNIOR

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS CONTENDO EPÍTOPOS NS1 DO
VÍRUS DA DENGUE PARA FINS DIAGNÓSTICOS E VACINAIS**

Recife
2017

ANTONIO FERNANDO DA PURIFICAÇÃO JÚNIOR

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS CONTENDO EPÍTOPOS NS1 DO
VÍRUS DA DENGUE PARA FINS DIAGNÓSTICOS E VACINAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Rafael Dhalia
Coorientador: Dr. Roberto Dias Lins Neto

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Purificação Júnior, Antonio Fernando da

Expressão de proteínas quiméricas contendo epítopos NS1 do vírus da dengue para fins diagnósticos e vacinais / Antonio Fernando da Purificação. – Recife: O Autor, 2017.

115 f.: il.

Orientadores: Rafael Dhalia, Roberto Dias Lins Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Dengue 2. Diagnóstico 3. Vacinas I. Dhalia, Rafael (orient.) II. Roberto Dias Lins Neto (coorient.) III. Título.

616.91852

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-209

ANTONIO FERNANDO DA PURIFICAÇÃO JÚNIOR

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS CONTENDO EPÍTOPOS NS1 DO
VÍRUS DA DENGUE PARA FINS DIAGNÓSTICOS E VACINAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em 24/02/2017

Banca Examinadora:

Dr. (Rafael Dhalia)

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães- Fiocruz/Pernambuco

Dr. (Tercilio Calsa Junior)

Universidade de Federal de Pernambuco- UFPE

Dr. (Rafael Freitas de Oliveira França)

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães- Fiocruz/Pernambuco

Dr. (Christian Robson de Souza Reis)

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães- Fiocruz/Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Antonio (meu Pai) e as mulheres da minha vida, Lúcia (minha mãe), Juliana e Joice (minhas irmãs) e a Rebeca (minha namorada), por todo amor dispensado e pelo apoio e incentivo a conquistar mais uma vitória na minha vida.

Aos familiares que diretamente e indiretamente me ajudaram nesta caminhada. Em especial a minha vó que a ausência física não me faz esquecer a sua importância para essa conquista e a certeza de que se presente estaria muito feliz, a minha admiradora, muito obrigado pelo seu amor.

Rafael Dhalia e Roberto Lins, meus orientadores, por ter aceitado me conduzir no desenvolvimento deste trabalho, pela dedicação, disponibilidade e estímulo.

A Bruna Caiado e Danilo Coelho pelo auxílio e parceria, importantes para que esse trabalho acontecesse.

A todos os mestres que fizeram parte da minha formação educacional pela paciência, carinho, compreensão e pelos ensinamentos oferecidos.

Aos professores da Pós-graduação em genética da Universidade Federal de Pernambuco pela atenção e contribuição em minha formação profissional.

Em especial às minhas amigas Lays Marques, Klarissa Miranda, Elisa de Almeida, Tâmis Rêgo, Morganna Costa, Deborah Guimarães e a todos do LaVITE que estiveram ao meu lado pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus amigos da minha cidade natal por compreenderem minha ausência e torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu amigo e irmão Jefferson, companhia e auxílio em muitos momentos difíceis desta caminhada.

Agradeço ao suporte financeiro deste projeto, em especial à Fundação Oswaldo Cruz, onde este projeto foi realizado, mais especificamente ao Departamento de Virologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife-PE, ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS), ao CNPq.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Muito Obrigado!

RESUMO

A dengue é uma importante doença de aspecto emergente e um grande desafio para a saúde pública mundial. No mercado, existe apenas uma vacina licenciada que não é totalmente eficaz na prevenção da doença. Também existem dificuldades para se expressar antígenos virais em sistemas procarióticos para uso no diagnóstico sorológico. O presente estudo, por meio da engenharia de proteínas, propõe moléculas alternativas de interesse diagnóstico e/ou vacinal para a dengue. Com o uso de ferramentas computacionais seguindo a estratégia “*epitope-scaffolding*”, elementos estruturais da NS1 de dengue (*epitope*) foram transplantados para a TOP7 (*scaffold*). Os genes sintéticos para as variantes dessa proteína, levando em consideração os 4 sorotipos de dengue, totalizando 4 proteínas recombinantes, foram otimizados, sintetizados comercialmente e clonados em vetor de expressão. As proteínas recombinantes tiveram sua expressão confirmada por ensaios de *imunoblot* e purificadas por cromatografia de afinidade, apresentando alto rendimento e solubilidade. Foram realizados ELISAs, com soros de pacientes infectados com DENV-3, para avaliação imunológica das proteínas quiméricas expressas. Os sinais detectados para as quimeras sugerem que elas são potencialmente imunogênicas.

Palavras-chave: NS1. Dengue. engenharia de proteínas. ELISA.

ABSTRACT

Dengue is an important emerging disease and a major public health challenge worldwide. Currently, there is only one licensed vaccine that is not fully effective in preventing the disease. There are also difficulties in expressing viral antigens in prokaryotic systems for use in serological diagnosis. The present study, through the engineering of proteins, proposes alternative molecules to be employed in strategies for diagnostics and/or vaccines for dengue. With the use of computational tools following the epitope-scaffolding approach, structural elements of dengue NS1 (epitopes) were transplanted to the TOP7 protein (scaffold). Synthetic genes for 4 recombinant proteins, taking into account the 4 serotypes of dengue, were optimized, commercially synthesized and cloned into expression vector. The cells of *Escherichia coli* BL21 were transformed with the respective plasmid constructs. Proteins were confirmed by immunoblot assays and purified by affinity chromatography, exhibiting high yield and solubility. ELISAs, with sera from patients infected by DENV-3, were performed for the immunological evaluation of expressed chimeric proteins. Signals detected for the chimeras suggest that they are potentially immunogenic.

Keywords: **NS1. Dengue. engineering of proteins. ELISA.**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Regiões onde a dengue tem sido reportada casos de dengue e as áreas de risco de transmissão da doença.....	17
Figura 2- Mapa global das rotas de transporte aéreo.....	18
Figura 3- Relação de casos e óbitos provocado por dengue.	20
Figura 4- Entrada dos sorotipos da dengue no Brasil	20
Figura 5- Distribuição dos casos notificados de dengue 1990-2015.	22
Figura 6- Estrutura da partícula de DENV.....	23
Figura 7- Esquemas de organização do genoma do DENV e da poliproteína precursora.	24
Figura 8- Estrutura cristalográfica da NS1 de DENV-1 (PDB ID: 4OIG).....	28
Figura 9- Ciclo de transmissão do vírus da dengue	29
Figura 10- Possível criadouro do mosquito Aedes, recipiente com água parada. 30	
Figura 11- Modelo esquemático do ciclo de vida do vírus da dengue (DENV)	32
Figura 12- Representação esquemática do processo de entrada do vírus da dengue.	33
Figura 13- Possíveis formas de diagnóstico da doença de acordo com tempo de doença do paciente	44
Figura 14- Os principais tipos de ELISA.....	46
Figura 15- Representação da estrutura da proteína sintética TOP7	52
Figura 16- Protocolo de engenharia de proteínas	56
Figura 17- O vetor pRSETA	59
Figura 18- Representação cartoon das estruturas 2S20-30_TOP7	68
Figura 19- Linearização do vetor pRSETA.....	70

Figura 20- Corrida eletroforética de produtos da digestão do DNA dos Clones selecionados para verificação da clonagem.....	71
Figura 21- (A) Teste de condições de expressão em pequena escala, (B) Expressão em larga escala e purificação, (C) <i>Imunoblot</i> com anticorpo anti-histidina	72
Figura 22- Caracterização antigênica das quimeras NS1-TOP7 por ELISA de indireto de captura.....	73
Figura 23- Caracterização antigênica das quimeras NS1-TOP7 por ELISA de indireto de captura.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atuais candidatas a vacina da Dengue em diferentes fases de ensaios clínicos	39
Tabela 2- Sequências selecionadas a partir do gráfico de hidropatia.	66
Tabela 3- Seleção de proteínas construídas usando a TOP7 (scaffold)	67
Tabela 4- Região conservada 222-232 da NS1 em cada sorotipo.	68
Tabela 5- Sequências de aminoácidos das proteínas expressas em sistema procaríoto	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMP	Ampicilina
ADE	Antibody-dependent enhancement, Aumento dependente de anticorpo
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Albumina sérica bovina)
CDC	Centers for Diseases Control, Centros para Controle de Doenças
DENV	Vírus da dengue
DF	Dengue clássica
FC	Fixação do complemento
FHD	Dengue hemorrágica
FA17D	Cepa vacinal febre amarela 17D
HIS	Histidina
SCD	Síndrome do choque da dengue
DNA	Desoxiribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
kDa	kiloDaltons
IPTG	β -1-Disopropil-tiogalactopiranosideo
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LB-AMP	Meio de cultura Luria-Bertani acrescido de ampicilina
mAb	Anticorpo monoclonal
MAC-ELISA	ELISA de captura de Imunoglobulina M
ml	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
ng	Nanograma
NS1	Proteína Não-estrutural 1

OD Densidade óptica

ORF Open reading frame, Fase de leitura aberta

PBS Phosphate Buffer Saline (Tampão salina fosfato)

PDB Protein Data Bank

Pb Pares de base

PCR Reação em cadeia da polimerase

RMSD Desvio quadrático médio

rpm Rotações por minuto

SCD Síndrome do choque da dengue

SDS Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)

µg micrograma

µl microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE.....	16
2.1.1. No mundo	16
2.1.2. No Brasil	18
2.2. AGENTE ETIOLÓGICO	22
2.3. ESTRUTURA E GENOMA VIRAL.....	23
2.4. PROTEÍNAS VIRAIS	24
2.4.1. Proteínas Estruturais	25
2.4.2. Proteínas Não Estruturais	25
2.4.2.1. NS1	26
2.5. CICLO DE VIDA DO DENGUE ENTRE SERES HUMANOS E MOSQUITOS 28	
2.6. RESPOSTA IMUNE	33
2.7. SINAIS CLÍNICOS DE DENGUE.....	35
2.7.1. Dengue clássica- DF	35
2.7.2. Dengue hemorrágica- FHD	36
2.7.3. Dengue síndrome do choque- SCD	36
2.8. PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	37
2.8.1. Controle vetorial	37
2.8.2. Desenvolvimento de Antivirais	38
2.8.3. Vacinas	39
2.8.3.1. Vacinas atenuadas vivas da dengue	40
2.8.3.2. Vacinas quiméricas vivas da dengue	40
2.8.3.3. Vacinas inativadas contra a dengue	41

2.8.3.4. Proteínas recombinantes, DNA e subunidades de vacinas contra dengue.....	42
2.9. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	42
2.9.1. Isolamento viral	44
2.9.2. Amplificação do Ácido Nucléico	45
2.9.3. Diagnóstico sorológico	45
2.9.3.1. Ensaio Hemaglutinação.....	46
2.9.3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA.....	46
2.10. PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	49
2.11. TOP7.....	51
3. OBJETIVOS	55
3.1. OBJETIVO GERAL.....	55
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
4. MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1. OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS POR MÉTODOS COMPUTACIONAIS.....	56
4.1.1 Seleção das Sequências da NS1	57
4.2. OTIMIZAÇÃO DOS GENES PARA EXPRESSÃO EM SISTEMA BACTERIANO.....	57
4.3. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO PRSETA (INVITROGEN) .	57
4.3.1. Preparação de células competentes	57
4.3.2. Preparação do vetor de expressão pRSETA (Invitrogen)	58
4.4. PREPARAÇÃO DOS VETORES CONTENDO OS GENES OTIMIZADOS	60
4.5. SUBCLONAGEM DOS GENES OTIMIZADOS NO VETOR PRSETA DE EXPRESSÃO BACTERIANA.....	60

4.6.	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS	61
4.7.	PURIFICAÇÃO PROTÉICA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	62
4.8.	ENSAIO DE IMMUNOBLOT.....	63
4.9.	AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DENV NS1	63
4.9.1.	ELISA de captura para a proteína DENV NS1	63
4.10.	COORTE SOROLÓGICA.....	64
4.11.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	65
5.	RESULTADOS	66
5.1.	SELEÇÃO DAS SEQUENCIAS DA NS1 E OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS POR MÉTODOS COMPUTACIONAIS.	66
5.2.	SUBCLONAGEM DOS GENES OTIMIZADOS EM VETOR DE EXPRESSÃO BACTERIANO	69
5.3.	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS	71
5.4.	ELISA DE CAPTURA PARA A PROTEÍNA DENV NS1-TOP7.....	73
6.	DISCUSSÃO	75
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	81
	REFERÊNCIAS	82
	CURRICULUM VITAE (LATTES)	107

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma arbovirose causada pelo vírus da dengue (DENV), pertencente ao gênero *Flavivirus* (SAM *et al.*, 2016). Devido à sua crescente incidência e progressiva propagação geográfica, tornou-se um grande desafio para a saúde pública mundial (ROSE *et al.*, 2016). A pandemia de dengue mundial parece ter começado nas regiões da Ásia e do Pacífico, onde a primeira epidemia de dengue foi relatada, em 1779-1780 (GUBLER e CLARK, 1995). Hoje a doença é endêmica em 128 países (WHO, 2014) e responsável por cerca de 390 milhões de infecções por ano (BHATT *et al.*, 2013), causando em torno de 20.000 mortes anualmente (GUZMAN *et al.*, 2010).

As características clínicas da doença variam desde quadros assintomáticos/oligossintomáticos até dengue hemorrágica e a síndrome do choque da dengue, graves e por vezes fatais (BHATT *et al.*, 2013, HALSTEAD e COHEN, 2015, MURPHY e WHITEHEAD, 2011). Por se tratar de uma doença de sintomas genéricos, o diagnóstico com base apenas nas características clínicas não é confiável, e deve ser confirmado por testes laboratoriais (SHU e HUANG, 2004).

Um diagnóstico rápido, preciso e de baixo custo é de extrema importância, principalmente em regiões endêmicas, para a vigilância epidemiológica, estudos patológicos, clínicos e imunológicos da doença e manejos clínicos apropriados dos pacientes. No entanto, os principais sistemas de diagnóstico que fazem uso da produção de antígenos apresentam inúmeras limitações, tais como dificuldade de expressão das proteínas diagnósticas em sistemas procarióticos, excessivo tempo de processamento e custo final elevado.

Também ainda não está disponível uma vacina tetravalente eficaz, que possa proporcionar imunidade a longo prazo contra os quatro sorotipos em todas as populações alvo. Existe um consenso de que a utilização de uma vacina eficaz é a melhor opção para controlar esta doença (DOUGLAS *et al.*, 2009). Uma grande variedade de vacinas contra o vírus da dengue (DENV) está sendo

elaborada e testada, porém há algumas limitações no desenvolvimento de uma vacina eficiente (DE ALWIS *et al.*, 2014).

O Instituto Sanofi Pasteur propôs uma vacina tetravalente viva, recombinante e atenuada com eficácia de 50% contra DENV-1, 35% contra DENV-2, 78.4% contra DENV-3 e 75.3% contra DENV-4, em testes fase 3 com crianças asiáticas (CAPEDING *et al.*, 2014). A mesma vacina obteve eficácia de 50.3% para DENV-1, 42.3% para DENV-2, 74.0% para DENV-3 e 77.7% para DENV-4 em testes fase 3 com crianças da América Latina (VILLAR *et al.*, 2015).

Uma forma alternativa de se produzir moléculas imunorreativas com diferentes finalidades, entre as quais a produção de antígenos vacinais e de diagnóstico, tem sido pela técnica “*epitope-scaffolding*” assistida por ferramentas computacionais (SAMISH *et al.*, 2011). Esta estratégia é baseada no desenvolvimento racional de proteínas sintéticas, elaboradas para apresentarem solubilidade, estabilidade e também uma exposição conformacional nativa do epítipo de interesse. Esse tipo de abordagem tem sido descrita como promissora para a produção de novos antígenos (CORREIA *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2013).

Com base nessa abordagem o presente trabalho propôs novos antígenos quiméricos do vírus da dengue, eficazes em termos sensibilidade e especificidade. Para contornar as dificuldades, estabilidade e solubilidade, nos processos de expressão e purificação de proteínas virais recombinantes, nesse trabalho foi proposto a utilização da TOP7, uma proteína carreadora solúvel e altamente estável, carreando epítopos da proteína NS1 do vírus da Dengue.

Já a escolha da proteína NS1 do vírus da dengue como antígeno-alvo neste estudo, se deu, pois essa proteína é um importante biomarcador para o diagnóstico precoce de infecções por dengue e também tem sido intensamente investigada como um alvo potencial para vacinas e terapias antivirais baseadas em anticorpos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE

2.1.1. No mundo

O termo dengue é de origem espanhola e significa melindre, manha, uma referência ao estado de moleza e prostração que o indivíduo doente apresenta depois de ser infectado pelo vírus (BRASIL, 2010). O primeiro caso clínico de infecção por dengue foi relatado em 1789 por Benjamin Rush, médico, que caracterizou a doença como uma "febre remitente biliar" (RUSH, 1789). O termo febre da dengue (DF) foi usado como um nome padrão para a doença após 1828 (MUÑOZ, 1828). Em 1903, Graham apontou a importância do *Aedes aegypti* na transmissão desta doença, confirmado anos depois (CHANDLER; RICE, 1923; CLELAND *et al.*, 1919).

O primeiro isolamento do vírus da dengue aconteceu no Japão em soldados japoneses (KIMURA; HOTTA, 1944). No mesmo período pesquisadores americanos conseguiram isolar o vírus de soldados americanos provenientes do Havaí e posteriormente em soldados vindos da Nova Guiné. Nos dois primeiros casos o vírus foi denominado de DENV-1 e DENV-2 no isolamento da Nova Guiné (SABIN; SCHLESINGER, 1945). Os sorotipos DENV-3 e o DENV-4 foram isolados em 1956, nas Filipinas (HAMMON *et al.*, 1960).

A incidência da dengue em todo o mundo aumentou drasticamente nas últimas cinco décadas (WHO, 2009). As áreas infestadas com o vetor também aumentaram, se espalhou para o sul da China, países do Oceano Pacífico e América (GUBLER, 2010) e hoje 40% da população mundial vivem em áreas de risco para doença (**figura 1**) (CDC, 2013). Os custos mundiais diretos e indiretos relacionados com dengue são grandes, atendimento médico, vigilância, controle de vetores e perda de produtividade, sendo estimado em cerca de US\$ 39 bilhões por ano (SELCK *et al.*, 2014).

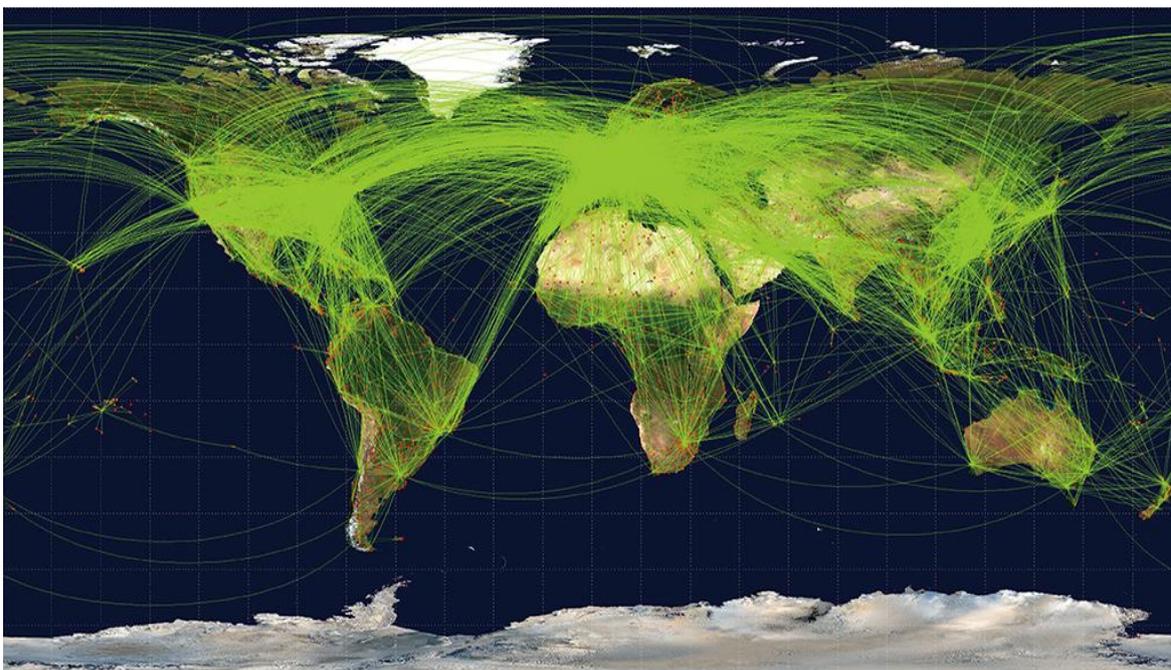
Figura 1- Regiões onde têm sido reportados casos de dengue e as áreas de risco de transmissão da doença



Nota: As linhas isotérmicas (janeiro/julho) delimitam a área de risco para dengue, onde essa faixa de temperatura possibilita a sobrevivência do *Aedes aegypti*, o principal vetor do vírus. Fonte: adaptado de WHO, 2014.

Estima-se que 390 milhões de pessoas são infectadas com dengue anualmente no mundo, dos quais 96 milhões manifesta sintomas clínicos aparentes e necessita de hospitalização (BHATT *et al.*, 2013). A rápida expansão mundial do DENV deve-se ao intenso processo de urbanização, mudanças climáticas, aumento da população, aumento de viagens internacionais (**figura 2**) e a falta de medidas eficazes de controle dos mosquitos transmissores (GUBLER, 2006, MOI *et al.*, 2016). As projeções apontam que até 2080, mais de 5 bilhões de pessoas poderão estar expostas ao risco de infecção por esse vírus (HALES *et al.*, 2002). Assim, há uma necessidade urgente de melhoria na vigilância sorológica para permitir que as autoridades se preparem adequadamente para um surto.

Figura 2- Mapa global das rotas de transporte aéreo.



Nota: A rápida locomoção de pessoas de áreas endêmicas para diferentes pontos do planeta pode favorecer a expansão da dengue e casos autóctones podem acontecer se presente os vetores de transmissão facilitando o surgimento de novas áreas de transmissão do vírus. Fonte: Adaptado de KILPATRICK; RANDOLPH, 2012.

2.1.2. NO BRASIL

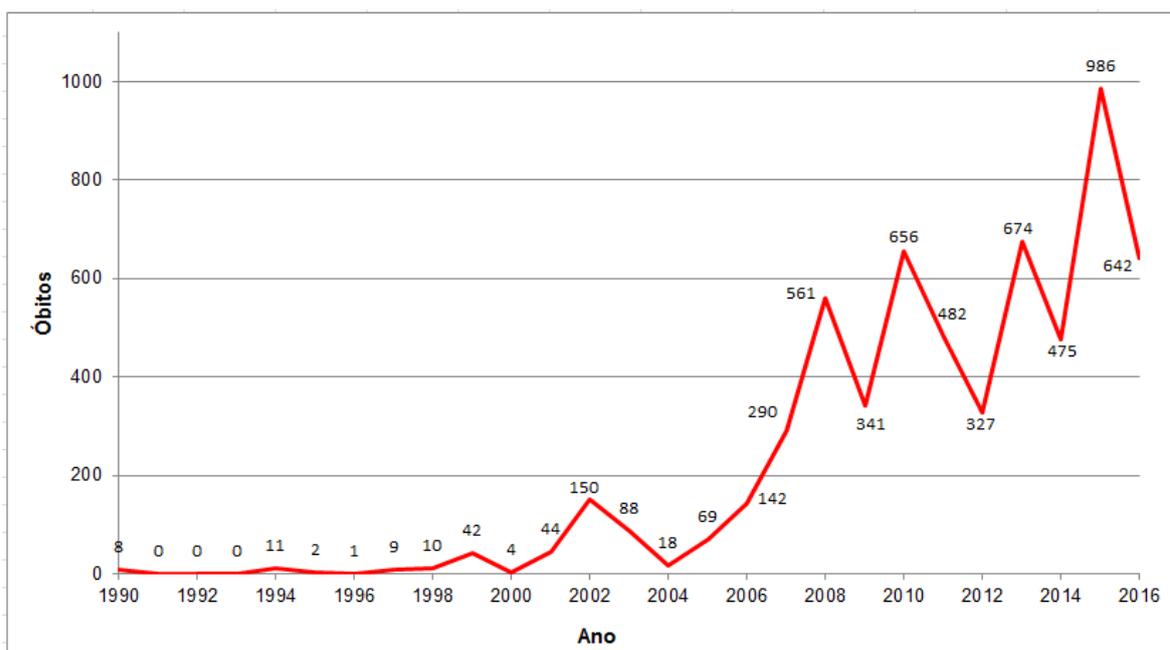
A dengue é um dos maiores problemas de saúde pública do Brasil. Considerado um país tropical, tem o clima quente e úmido fornece um ambiente receptivo, e altamente favorável para a proliferação do principal vetor da dengue. A atividade do DENV ocorre durante todo o ano, mas a maioria dos surtos e os mais altos níveis de infestação do vetor apresentam um padrão sazonal marcante, ocorrendo durante a estação chuvosa, de dezembro a maio, que também são os meses mais quentes do ano (SIQUEIRA *et al.*, 2005).

A primeira epidemia de dengue no Brasil aconteceu no estado do Rio de Janeiro em 1845 (Schneider; Droll, 2001). Outras três epidemias foram relatadas durante os anos de 1851, 1853 e 1916 no estado de São Paulo (COSTA, 2001). Na década de 50, houve a eliminação do mosquito transmissor, *A. aegypti*, consequentemente das doenças transmitidas por ele, na época não só a dengue, mas também a febre amarela (TEIXEIRA *et al.*, 1999).

A dengue voltou a aparecer no país em 1981 causando uma nova epidemia no estado de Roraima, devido a uma reinfestação em áreas urbanas pelo *A. aegypti* (PINHEIRO; NELSON, 1997; SCHNEIDER; DROLL, 2001). No entanto, a doença apenas recebeu atenção adequada em 1986 e 1987, após o DENV-1 ser introduzido no Rio de Janeiro (DICK *et al.*, 2012, SCHATZMAYR *et al.*, 1986, SIQUEIRA *et al.*, 2005, TEIXEIRA *et al.*, 2009). O DENV-1 também foi responsável por epidemias no Ceará e Alagoas em 1986 e em Pernambuco, em 1987 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

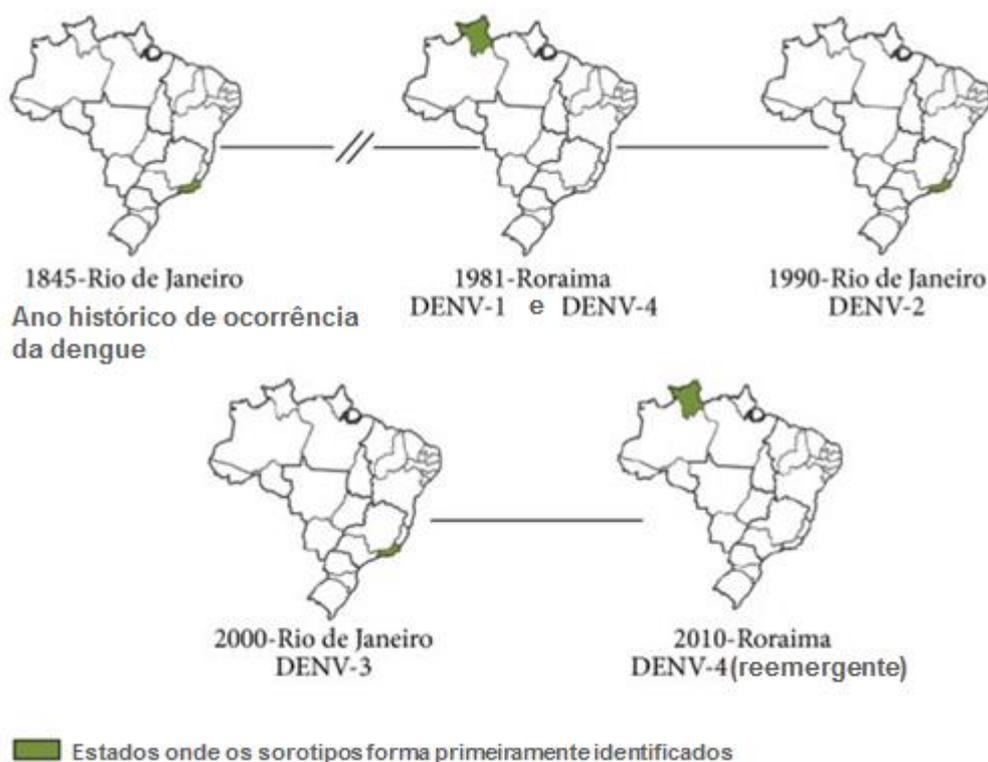
A doença se espalhou para diversos estados brasileiros no ano de 1994, atingindo as regiões Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro), Nordeste (Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, Piauí e Alagoas), Norte (Tocantins) e no Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal), com alta incidência na região Nordeste (FERES *et al.*, 2003). Atualmente o Brasil é uma área endêmica para dengue, onde a transmissão vem ocorrendo de forma continuada e com um relevante número de óbitos (**figura 3**). O país também tem enfrentado alguns períodos de epidemias, geralmente relacionado com a introdução de um novo sorotipo ou alteração do sorotipo predominante, em áreas anteriormente indenes (**figura 4**) (BRASIL, 2015).

Figura 3- Óbitos notificados relacionados com dengue nos últimos 26 anos.



Os números foram obtidos no site do Ministério da Saúde, acessado em <http://portalsaude.saude.gov.br/>.

Figura 4- Entrada dos sorotipos da dengue no Brasil

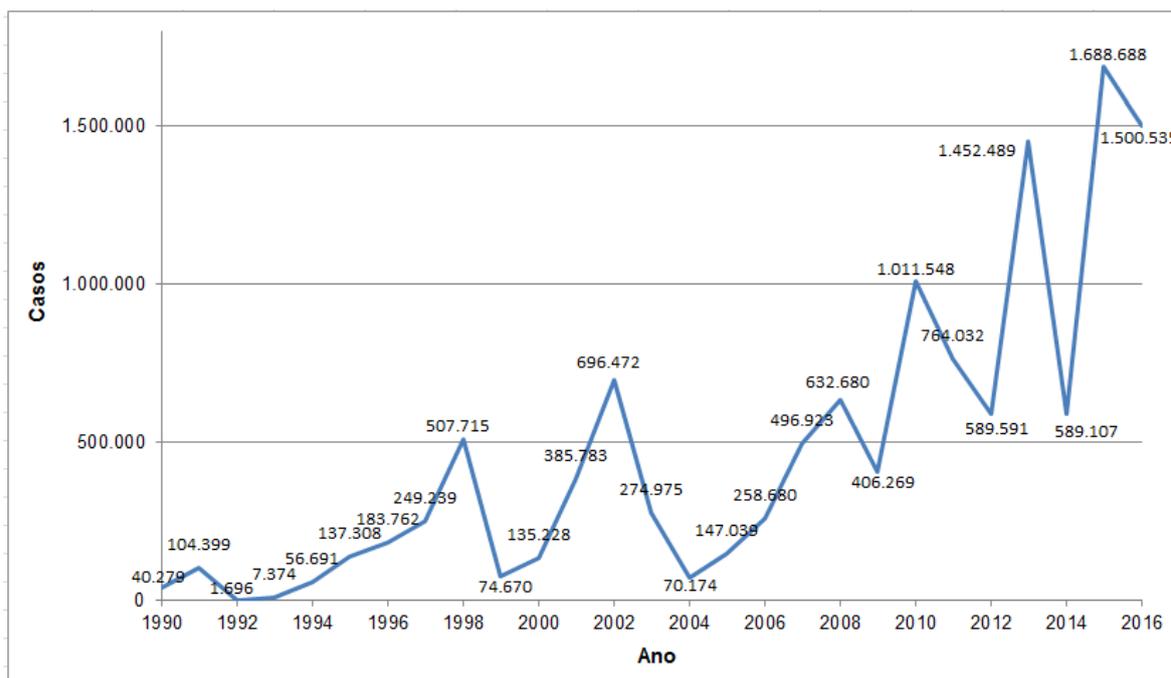


Nota: Cronologia de introdução dos sorotipos de dengue no Brasil. Os estados onde os sorotipos da dengue foram principalmente identificados são destacados em verde. A figura foi montada com informações coletadas da literatura como descrito no artigo. Fonte: adaptado de FARES *et al.*, 2015.

Em 2015, foram registrados 1.649.008 casos prováveis de dengue no Brasil – casos notificados (**figura 5**). A região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (1.026.226 casos; 62,2%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 18,9%), Centro Oeste (220.966 casos; 13,4%), Sul (56.187 casos; 3,4%) e Norte (34.110 casos; 2,1%). Foram confirmados 1.569 casos de dengue grave e 863 óbitos, o que representa um aumento no país de 82,5% em comparação com o mesmo período de 2014, quando foram confirmados 473 óbitos (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – BRASIL, 2016).

Em 2016, SE 1 a SE 52, foram registrados 1.500.535 casos prováveis de dengue (**figura 5**), a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (858.273 casos; 57,2%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (324.815 casos; 21,6%), Centro Oeste (205.786 casos; 13,7%), Sul (72.650 casos; 4,8%) e Norte (39.011 casos; 2,6%). Em 2017, até a SE 7 (1/1/2017 a 18/02/2017), foram registrados 48.177 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 23,4 casos/100 mil hab., e outros 18.878 casos suspeitos foram descartados (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – BRASIL, 2017).

Figura 5- Distribuição dos casos notificados de dengue 1990-2015.



Os números foram obtidos no site do Ministério da Saúde, acessado em <http://portalsaude.saude.gov.br/>.

2.2. AGENTE ETIOLÓGICO

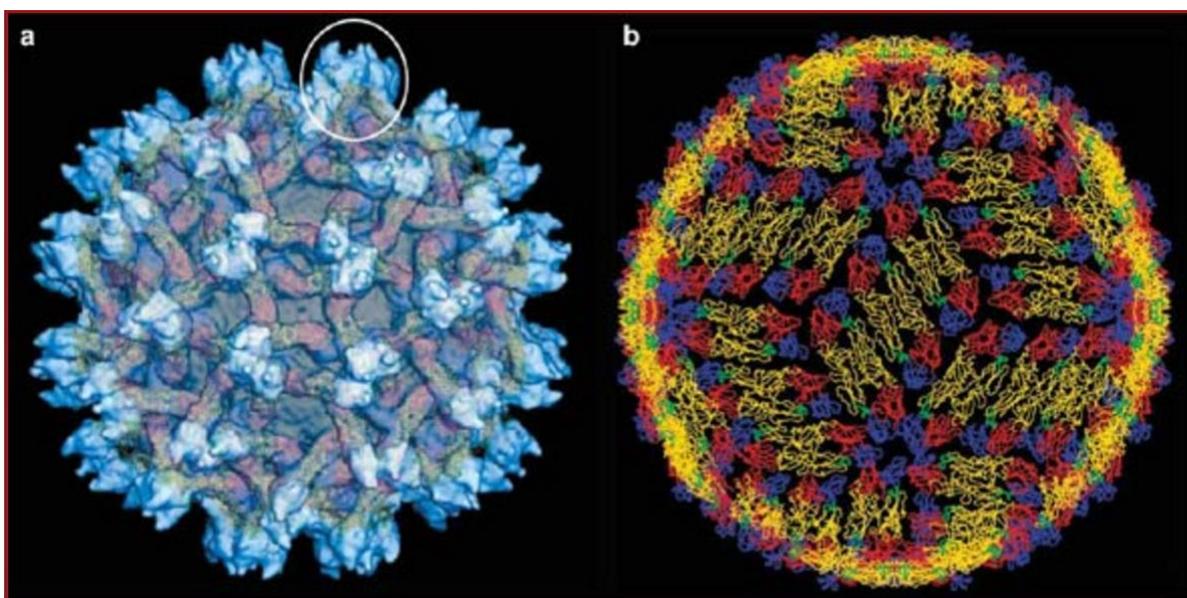
O DENV é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivírus*, um grupo constituído por vírus antígenicamente relacionados que causam doença em seres humanos, incluindo o vírus do zika (ZIKAV), o vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da febre amarela (YFV), vírus do Nilo Ocidental (WNV) (MOI *et al.*, 2016).

Existem quatro sorotipos antígenicamente relacionados (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), que diferem em 25-35 pares de bases na sequência de nucleotídeos (LEE *et al.*, 2012). A infecção com um sorotipo confere imunidade permanente contra esse sorotipo, mas apenas uma proteção temporária contra a infecção por outros sorotipos, e todos os sorotipos estão envolvidos com o acometimento da enfermidade e com o surgimento de formas graves (SHUIPING *et al.*, 2007).

2.3. ESTRUTURA E GENOMA VIRAL

Os vírions maduros são esféricos (**figura 6**), pequenos, medem entre 40 e 60 nanômetros (nm) de diâmetro e são envelopados (LINDENBACH; RICE, 2003; MURPHY, 1980). Internamente, apresentam um nucleocapsídeo de estrutura icosaédrica de aproximadamente 30nm, o qual é envolto por uma bicamada lipídica derivada de membranas da célula hospedeira (RAY; SHI, 2006; LINDENBACH *et al.*, 2007).

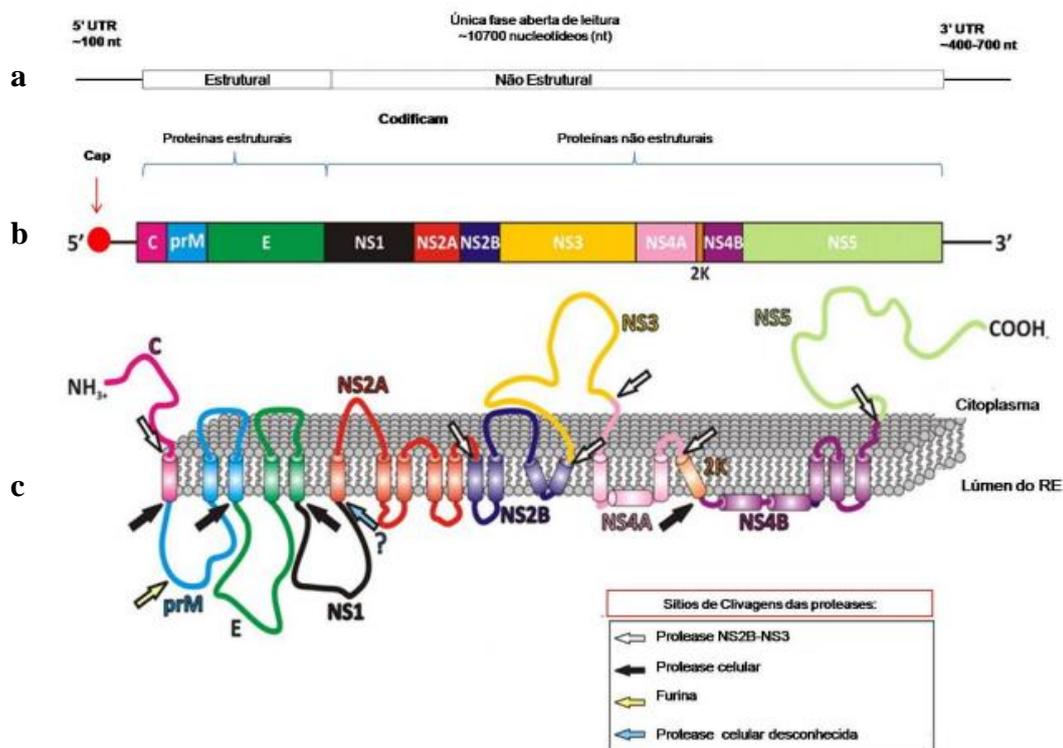
Figura 6- Estrutura da partícula de DENV.



Nota: Em (A) Partícula imatura. Possui 60 espículas (círculo) proeminentes em sua superfície, tornando-a menos lisa que a partícula madura. (B) Estrutura do vírus maduro. A membrana é lisa e é completamente recoberta por uma estrutura protéica. Fonte: Adaptado de MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN (2004).

O RNA é de cadeia simples, de sentido positivo, com genoma de aproximadamente 11 kb, composto por 10 genes, contendo um grande quadro de leitura aberta (ORF) (ROOPASHRI *et al.*, 2015). Este RNA viral codifica uma longa poliproteína precursora que, após sucessivas clivagens por proteases do hospedeiro vertebrado e do próprio vírus (RICE *et al.*, 1985), resulta na formação de três proteínas estruturais (C, prM e E) e de sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (**figura 7**) (CHAMBERS *et al.*, 1990).

Figura 7- Esquemas de organização do genoma infeccioso do DENV e da poliproteína precursora.



Nota: (a) O genoma é constituído por um RNA fita simples com polaridade positiva e apresenta em sua extremidade 5' UTR uma estrutura denominada *cap*. A extremidade 3' UTR não contém uma cauda poliadenilada. (b) O genoma do DENV possui apenas uma única fase aberta de leitura e sua tradução é direcionada para o Retículo Endoplasmático (RE), gerando uma poliproteína precursora. (c) Ao longo da sequência da poliproteína existem sítios de clivagens onde proteases, celular e viral, atuam gerando assim 3 proteínas estruturais (C, prM/M e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Fonte: Adaptado de ASSENBERG *et al.*, 2009.

2.4. PROTEÍNAS VIRAIS

A síntese protéica ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RER), e as proteínas estruturais são ancoradas nele no lado luminal, onde ocorrem montagem e maturação do virion. A ORF é flanqueada por regiões 5' e 3' não traduzidas altamente estruturadas (UTRs), que desempenham papéis reguladores na tradução das proteínas virais e da replicação do genoma do RNA viral (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

2.4.1. Proteínas Estruturais

A proteína C contém 112 a 127 aminoácidos e aproximadamente 13,5 kDa. Possui um domínio hidrofóbico que interage com membranas celulares, sendo atribuído à mesma um papel na montagem viral. A proteína C nascente apresenta um domínio hidrofóbico C-terminal que atua como uma sequência sinal transmembrana para a translocação da prM para dentro do lúmen do retículo endoplasmático (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

A proteína prM (26 kDa) é a glicoproteína precursora da proteína de Membrana, M (8 kDa) que sofre uma clivagem proteolítica durante a morfogênese viral e leva a formação da proteína M. A principal função de prM é evitar a exposição prematura da forma fusogênica da proteína ENV durante a passagem pela via secretória celular (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008; CHAMBERS *et al.*, 1990; CLYDE; KYLE, 2006).

A proteína E do DENV, com 51 a 60 kDa, A proteína E destaca-se por ser o maior componente glicoprotéico presente na superfície do DENV, associada a numerosas atividades biológicas importantes. Ela atua como proteína ligante, interagindo com receptores presentes na superfície de células alvo e mediando a endocitose da partícula viral. Tal proteína é responsável pela fusão da bicamada lipídica do vírus à membrana citoplasmática da vesícula endossômica e participa da dissociação do nucleocapsídeo no citoplasma (CHANG, 1997; LINDENBACH; RICE, 2001).

2.4.2. Proteínas Não Estruturais

As proteínas não-estruturais (NS) estão envolvidas na modulação da resposta do hospedeiro e na replicação do RNA viral (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997). A NS2A, a NS2B, a NS4A e a NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas associadas à membrana e/ou a outras proteínas para exercerem seus papéis biológicos, envolvidos no ciclo replicativo do DENV. A NS4B aparentemente modula a replicação viral através da interação com outra proteína não estrutural a NS3. Além disso, a NS4B pode estar associada à inibição da resposta de interferon (IFN do tipo 1) em indivíduos infectados (LINDENBACH; RICE, 2001;

UMAREDDY *et al.*, 2006). Em particular, a NS2B se associa à porção proteásica da NS3 para formar uma serino-protease ativa (NS2B-NS3), que cliva junções protéicas na poliproteína viral (MELINO; PACI, 2007).

A NS3 (69-70 KDa) é caracterizada como uma proteína multifuncional com atividades de serino-protease (NS2B-NS3); de helicase (atua na dissociação da dupla fita de RNA sendo potencializada quando a NS3 está associada a NS4B durante a replicação do RNA viral); de NTPase (hidrolisa ATP para fornecer energia durante os processos de replicação); e de RTPase (atua provavelmente removendo o grupo fosfato da região 5' N-terminal que parece estar envolvido no processo de adição da estrutura *cap* na extremidade 5' UTR do genoma viral). Além disso, a interação NS3/NS5 pode estimular as atividades enzimáticas da proteína NS3 (nas porções helicase e NTPase). Em resumo, a NS3 exerce um papel fundamental no ciclo de vida dos flavivirus, participando ativamente do processamento da poliproteína e nos processos de replicação do RNA viral (ASSENBERG *et al.*, 2009; LINDENBACH; RICE, 2001; MELINO; PACI, 2007; UMAREDDY *et al.*, 2006).

A proteína NS5 possui peso molecular de aproximadamente 100-103 kDa e é a maior e mais conservada dentro dos flavivirus (LINDENBACH; RICE, 2001) com atividade de RNA polimerase dependente de RNA e atividade metiltransferase. Na porção C-terminal desta proteína localiza-se uma sequência com atividade de RNA polimerase dependente de RNA responsável pela replicação, sintetizando cópias negativas e positivas do RNA viral. As fitas negativas servem de molde para a transcrição das fitas positivas de RNA que serão utilizadas para a tradução de novas poliproteínas (LINDENBACH; RICE, 2001; MELINO *et al.*, 2007; QI *et al.*, 2008). O motivo metiltransferase, constituído de aproximadamente 320 resíduos de aa, localizado na porção N-terminal desta proteína é responsável pela adição do *cap* e pela metilação da extremidade 5' UTR (ASSENBERG *et al.*, 2009).

2.4.2.1. NS1

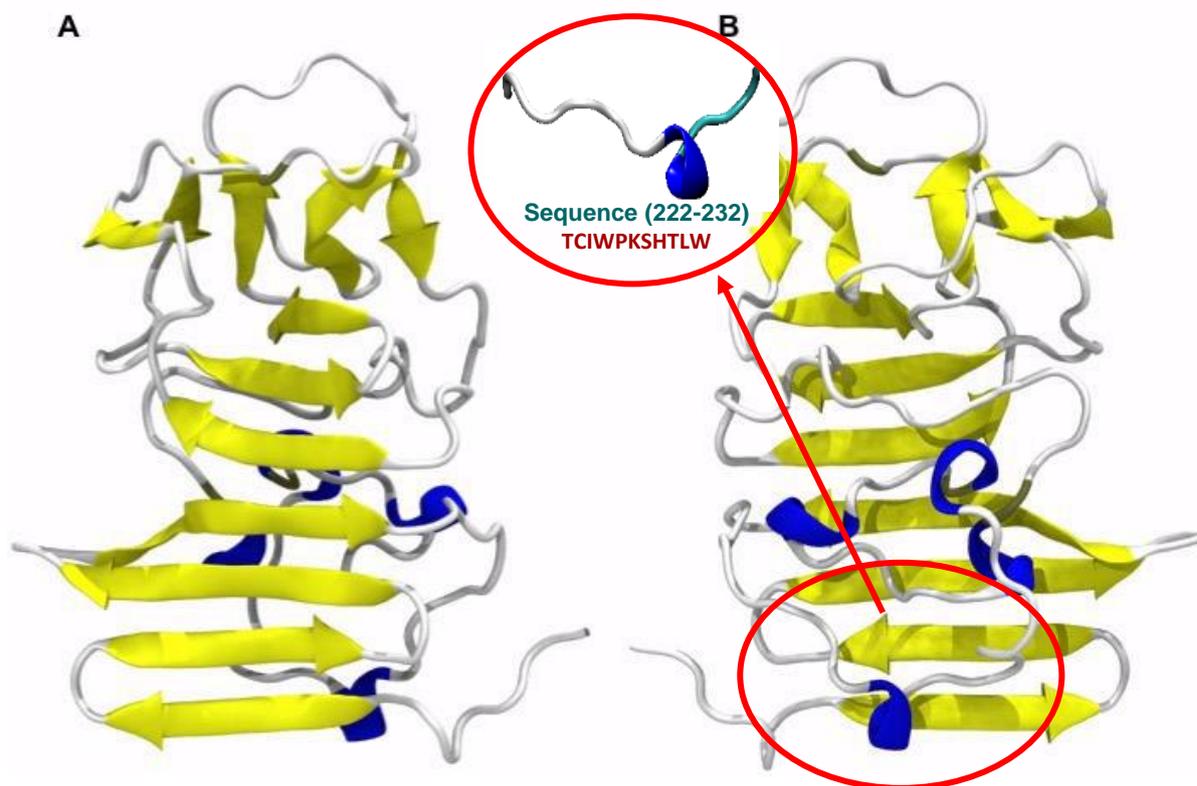
A proteína NS1 (**figura 8**), com aproximadamente 46-55 kDa, 352 aminoácidos, é uma glicoproteína com importante papel na replicação viral.

Reconhecidamente está envolvida na patogénia e na activação do sistema complemento (JACOBS *et al.*, 2000). O NS1 intracelular interage com várias proteínas do hospedeiro para auxiliar na replicação viral, tradução e produção de virion. Durante a infecção por flavivírus, NS1 interage e realocaliza estas proteínas no local da replicação viral (CERVANTES *et al.*, 2015).

A NS1 é encontrada tanto em sua forma ligada à célula quanto secretada em forma de hexâmeros, que circula no sangue da pessoa infectada. A secreção da proteína NS1 atinge níveis elevados nos soros de pacientes (RIGAU-PÉREZ *et al.*, 1998; YOUNG *et al.*, 2000). Os anticorpos contra esta proteína podem ser detectados em soro de pacientes antes mesmo do RNA viral ser detectado por RT-PCR (ALCON *et al.*, 2002), tornando-se um importante marcador da fase aguda da infecção.

Vários ensaios comerciais, teste rápidos, estão disponíveis para a detecção do antígeno NS1. O soro é o tipo mais comum de amostra, mas a NS1 de dengue também pode ser detectada em amostras de urina durante a fase aguda da infecção DENV (CHUANSUMRIT *et al.*, 2011). Por último, o antígeno NS1 podem ser detectados no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com sintomas neurológicos (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Figura 8- Estrutura cristalográfica da NS1 de DENV-1 (PDB ID: 4OIG)

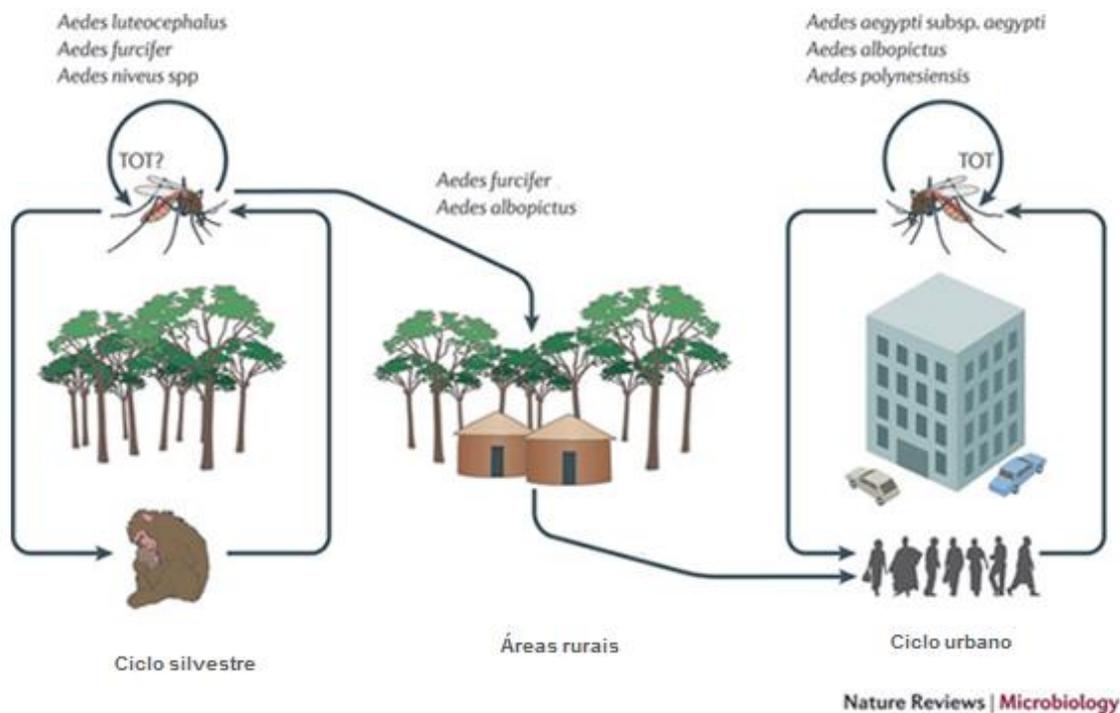


Nota: (a) Face estruturada e (b) face não-estruturada. Área em destaque em vermelho na face não-estruturada- referente a região do epítipo utilizado para a construção das quimeras desse estudo. No centro da figura, também em destaque, maiores detalhes da região que foi extraída da NS1 do DENV para inserção na TOP7 e a sequência de aminoácidos correspondente ao epítipo selecionado para produção da quimera estudada neste trabalho.

2.5. CICLO DE VIDA DO DENGUE ENTRE SERES HUMANOS E MOSQUITOS

O DENV é transmitido geralmente através de dois ciclos de vida, isto é, ciclo silvestre onde os mosquitos *Aedes* infectam os primatas não humanos em habitats de floresta tropical e o urbano onde há a infecção dos humanos (**figura 9**) (HALSTEAD *et al.*, 1988). O vírus da Dengue é transmitido pela picada da fêmea do mosquito *Aedes* infectada (LAMBRECHTS *et al.*, 2010).

Figura 9- Ciclo de transmissão do vírus da dengue



Nota: A transmissão silvestre do vírus do dengue, as áreas rurais onde o ciclo silvestre pode afetar populações humanas. Além disso, a transmissão transovariana (TOT), na qual os mosquitos infectados com vírus transferem o vírus para seus ovos (isso tem sido mostrado em algumas espécies). Fonte: adaptado de VASILAKIS *et al.*, 2011.

Os mosquitos transmissores da dengue são antropofílicos, vivem em torno de habitações humanas e encontram nos numerosos recipientes com água parada ao redor das casas (**figura 10**), tambores de armazenamento de água, tanques aéreos, garrafas, baldes e itens de resíduos descartados, seus principais criadouros. Entre a alimentação de sangue e ovoposição, mosquitos fêmeas adultas descansam dentro ou perto de habitações humanas (WHO, 2009). O ciclo de vida do mosquito *Aedes*, dura 8-10 dias. Consiste em duas fases: fase aquática (larvas, pupas) e terrestre (ovos, adultos) (KHETARPAL; KHANNA, 2016).

Figura 10- Possível criadouro do mosquito *Aedes*, recipiente com água parada.



Nota: Foto de uma casa de uma comunidade na cidade do Recife. Apesar do descaso da população na eliminação dos criadouros do mosquito *Aedes*, as pessoas menos favorecidas que vivem em comunidades acabam não tendo instruções adequadas para combater o vetor como também a ausência de saneamento básico apropriado. Desta forma a dengue, assim como outras arboviroses também é um problema social. Fonte: Elaborado pelo autor.

O *Aedes aegypti*, prevalente nos trópicos, tem sido o vetor mais importante nas regiões tropicais e subtropicais. Esse mosquito está intimamente associado com grandes epidemias de dengue, devido à sua capacidade de transmitir a doença de forma eficiente (MOI *et al.*, 2016).

Outro importante vetor é o *A. albopictus*, pois pode facilmente se adaptar a novos ambientes, incluindo regiões temperadas. A propagação deste vetor para países livres da *A. aegypti* tornou possível a entrada do vírus da dengue em novos locais (REZZA, 2012). *A. albopictus* é um importante vetor para a transmissão do DENV na China e na Europa (KRAEMER *et al.*, 2015).

Os mosquitos podem tornar-se infectados picando a pessoa doente, durante o estágio virêmico causado pelo DENV. Os vírus infectam as células epiteliais do intestino do mosquito e disseminam-se sistemicamente até as glândulas salivares e outros tecidos (CHENG *et al.*, 2016). Após um período de incubação de aproximadamente 11 dias, um mosquito infectado é capaz de transmitir o vírus aos indivíduos susceptíveis (NISHIURA *et al.*, 2007). As fêmeas

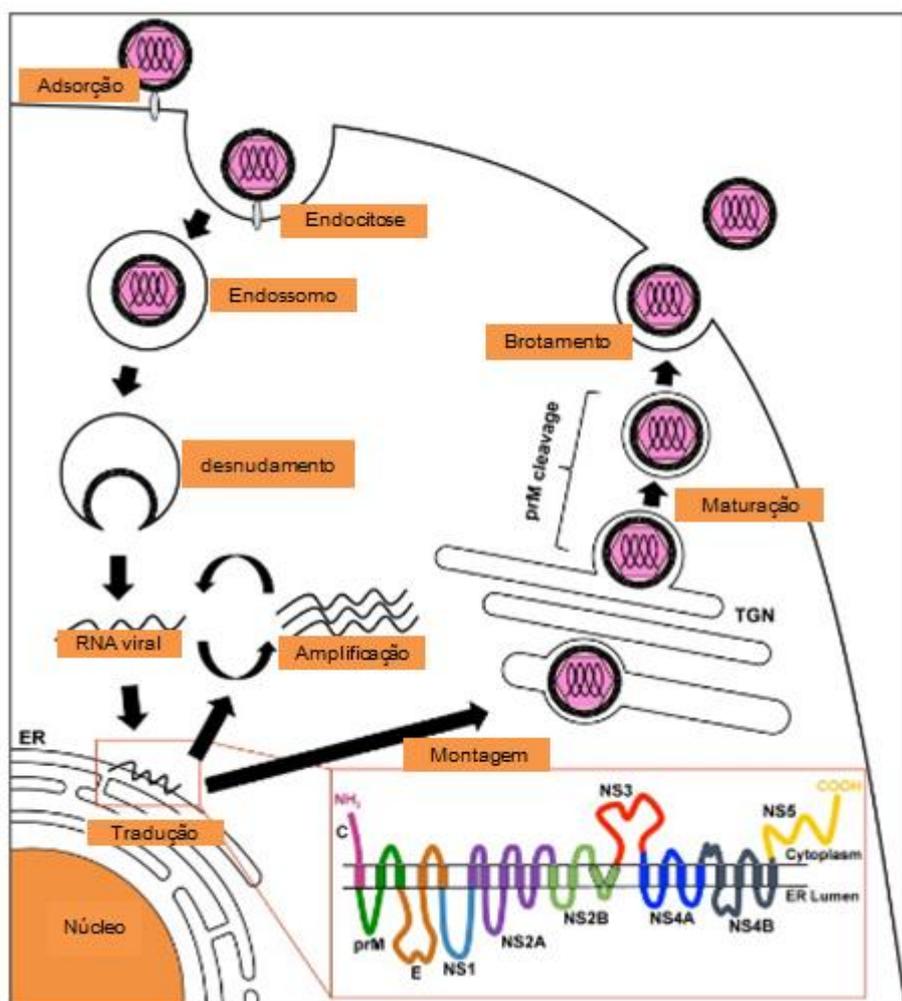
infectadas podem também transmitir o vírus à sua prole (através dos ovos), pela transmissão transovariana (GUBLER, 1998).

Embora o ciclo de transmissão de humano-humano (com o DENV sendo carregado pelo mosquito) ser considerado o método mais importante de propagação, a dengue também pode ser transmitida verticalmente durante a gravidez e através de transfusão sanguínea (PATTERSON *et al.*, 2016).

Já no corpo humano, o vírus se replica dentro de células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos, monócitos e células B). Infestando ainda mastócitos, células dendríticas e células endoteliais (KING *et al.*, 2000). O vírus pode infectar os leucócitos do sangue periférico, fígado, baço, linfonodos, medula óssea, timo, coração, rins, estômago, pulmões e possivelmente o cérebro, sugerindo passagem pela barreira hematoencefálica (HAYES *et al.*, 1992; PUCCIONI-SOHLER *et al.*, 2015).

Após o DENV ser introduzido no hospedeiro, inicia-se o ciclo de replicação viral (**figura 11**), consiste no desencadeamento de uma série de eventos ao nível da célula hospedeira permissiva, os quais são: adsorção, penetração, desnudamento, tradução, replicação, montagem, e brotamento das partículas virais (ANDERSON, 2003; CLYDE *et al.*, 2006).

Figura 11- Modelo esquemático do ciclo de vida do vírus da dengue (DENV)

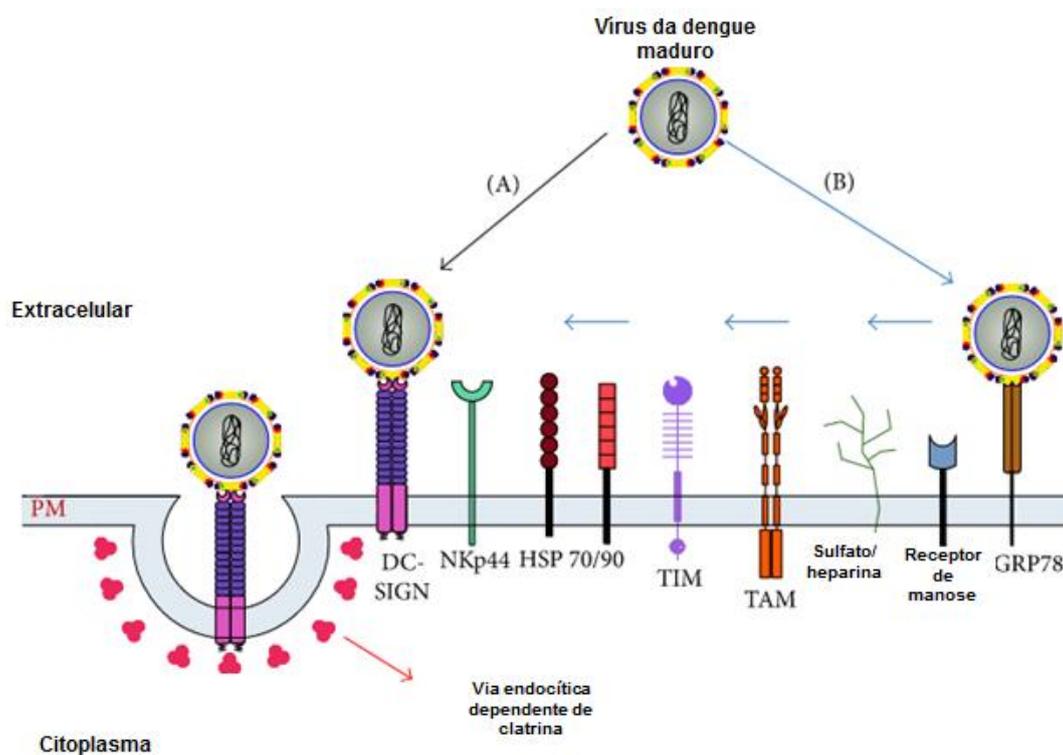


Nota: A entrada da partícula viral ocorre através da via de endocitose mediada por receptor. No pH ácido do endossoma a proteína E sofre mudanças conformacionais que levam a fusão das membranas viral e endossômica. O RNA viral é traduzido e inicia-se o processo de replicação. A montagem das partículas virais ocorre no RE, e as novas partículas recém-formadas, seguem pela via de secreção e completam a maturação na rede trans-Golgi. Posteriormente os vírus são liberados pela célula hospedeira. Adaptado: KATO; HISHIKI, 2016.

O DENV infecta as células através das interações entre as proteínas E das partículas virais e receptores celulares (CRUZ *et al.*, 2015) (**figura 12**). Após a ligação, o DENV é internalizado em células através de endocitose mediada pelo receptor clatrina e o tráfego feito pelo compartimento endossomal, no qual o pH baixo induz mudanças estruturais na proteína E, resultando em fusão da membrana viral. O RNA viral de cadeia positiva é então liberado no citoplasma. Como o RNA é de polaridade positiva de cadeia simples funciona como RNAm e é posteriormente traduzido pela maquinaria celular, gerando assim proteínas virais no retículo endoplasmático (RE) (KATO; HISHIKI, 2016).

A montagem das partículas do DENV ocorre no RE, e os virions brotam como partículas virais imaturas que incorporam 60 picos triméricos das proteínas prM e E. Estas partículas imaturas são então transportadas através do Golgi. Durante a saída, prM é clivado pela serina protease celular. Em seguida, as partículas virais maduras infecciosas são libertadas para o espaço extracelular através de exocitose e ganham a corrente sanguínea do hospedeiro infectado. Portanto, nesse período de viremia, um mosquito (*Aedes*) pode se infectar durante o repasto sanguíneo, assim o ciclo de vida do DENV é fechado (KATO; HISHIKI, 2016).

Figura 12- Representação esquemática do processo de entrada do vírus da dengue.



Nota: O virion maduro ou fica ligado diretamente a um receptor de membrana celular (A) ou utiliza vários factores de ligação (b) para desencadear finalmente a via endocítica dependente de clatrina. Adaptado de KHETARPAL; KHANNA *et al.*, 2016).

2.6. RESPOSTA IMUNE

As respostas imunitárias humoral, celular e inata do hospedeiro estão implicadas na progressão da doença e nos sinais clínicos mais severos, e desempenha papéis importantes tanto na proteção como na patogênese da doença (KURANE *et al.*, 2011; SANGKAWIBHA *et al.*, 1980). O papel paradoxal

da resposta imune do hospedeiro na evolução da doença, está associado à infecção consecutiva por dois sorotipos DENV diferentes. A base para a imunidade do hospedeiro na evolução da doença envolve (1) anticorpos neutralizantes de vírus dirigidos contra proteínas virais e (2) cascatas imunitárias desencadeadas pelas células T de memória ativada por epítomos virais (KURANE *et al.*, 2011; SANGKAWIBHA *et al.*, 1980).

A primeira exposição de um indivíduo a qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue é conhecida como infecção primária por dengue, que pode ser assintomática. Na infecção primária, altos títulos de anticorpos, imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG), aparecem em 3-5 e 6-10 dias, respectivamente, após o início da infecção. A presença de IgM é transitória, desaparecendo em 2-3 meses após o início da doença, enquanto a IgG persiste durante toda a vida (GUZMAN *et al.*, 2010). Assim, a infecção primária com um sorotipo particular proporciona imunidade ao longo da vida contra esse sorotipo, embora não proporcione imunidade cruzada de proteção contínua contra os demais sorótipos.

Estudos epidemiológicos demonstraram que pacientes com dengue primária, depois de um período de proteção cruzada, estão em maior risco de desenvolver dengue grave durante uma infecção consecutiva com outro sorotipo DENV. Esse fenômeno deve-se ao fato de que a resposta imune do hospedeiro em uma infecção secundária dirige uma resposta precoce contra o sorotipo da primeira infecção, mas não ao sorotipo infectante corrente. Assim a resposta das células T dirigida contra o sorotipo que infectou antes não confere proteção e ainda estão associadas com a ativação de cascatas imunes que induzem sintomas graves (KURANE *et al.*, 2011; MATHEW *et al.*, 1999).

Durante uma segunda infecção com sorotipo diferente, a presença de baixas quantidades de anticorpos heterotípicos (que formam complexos com DENVs) promove o acesso do vírus aos monócitos, via receptores de fixação do sistema complemento (Fc), levando a um aumento da carga viral e a gravidade da doença. Esse fenômeno é conhecido como ADE (Antibody-dependent enhancement). Os principais agentes deste fenômeno são os anticorpos reativos cruzados produzidos contra o laço de fusão e prM, que se verificam ser

fracamente neutralizante levando ao aumento da infecção em baixas concentrações (ALWIS *et al.*, 2011; DEJNIRATTISAI *et al.*, 2010). Embora tenha sido observado que a ADE resulta na gravidade da doença, nem todos os casos graves estão associados com infecções secundárias e nem mesmo todas as infecções secundárias progridem para as formas graves da doença (MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

Teorias propostas também sugerem que durante o processo de infecção pelo DENV, a ativação da célula endotelial causada por monócitos, células T, sistema complemento e várias outras moléculas inflamatórias é responsável pela perda de plasma. Já a trombocitopenia pode estar relacionada com alterações no megacariocitopoiese, que se manifesta por infecção de células hematopoiéticas humanas e o crescimento de células progenitoras comprometidas (GUZMAN *et al.*, 2003, WHO 2011).

2.7. SINAIS CLÍNICOS DE DENGUE

Os sintomas geralmente aparecem 4-7 dias após o período de incubação, após a picada de um mosquito infectado (MOI *et al.*, 2016). O espectro de doenças clínicas pode variar de doença assintomática a uma ampla gama de síndromes com manifestações clínicas graves, alterações na permeabilidade microvascular endotelial e nos mecanismos tromborreguladores (SHAMIMUL *et al.*, 2016). Essas condições provavelmente representam estágios progressivamente graves de um espectro contínuo de dengue (SWAMINATHAN; KHANNA, 2013).

2.7.1. Dengue clássica- DF

DF é uma febre auto-limitante, durando geralmente por 5-7 dias. As características clínicas do DF variam de acordo com a idade do doente. Os bebês e crianças pequenas podem ter doença febril indiferenciada com erupção maculopapular. As crianças mais velhas e adultos podem ter um leve quadro febril ou doença grave com febre alta (geralmente bifásica), dor de cabeça intensa, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, e petequias. Leucopenia e trombocitopenia são geralmente observadas em todas as idades. Em alguns

casos, podem estar presentes complicações hemorrágicas como sangramento gengival, sangramento gastrointestinal, epistaxe, hematúria e menorragia (ROOPASHRI *et al.*, 2015; SWAMINATHAN; KHANNA, 2013;).

2.7.2. Dengue hemorrágica- FHD

A dengue hemorrágica (FHD) é a forma mais grave da doença e ocorre em até 5% dos casos de dengue (ROCHE; GOULD, 2013). Caracterizada por sintomas de DF juntamente com trombocitopenia, manifestações hemorrágicas e vazamento plasmático. Para a OMS a FHD trata-se de uma febre com duração de 2-7 dias, ocasionalmente bifásica, com tendências hemorrágicas evidenciadas por pelo menos uma das seguintes situações: Um teste de torniquete positivo, petequias ou púrpuras, hemorragia em mucosas, hematemese, melena, contagem de plaquetas $\leq 100\ 000/\text{mm}^3$ (WHO, 2009).

O extravasamento de plasma é o evento fisiopatológico mais significativo na determinação da gravidade da FHD, também é a diferença mais importante entre FHD e DF. Podem ser observados sinais de insuficiência circulatória, tais como irritabilidade, extremidades úmidas frias, face enrugada e inquietação. Esta crise geralmente persiste por 24-36 horas. A fase crítica é geralmente atingida no final da doença febril, marcada por uma rápida diminuição da temperatura e frequentemente acompanhada de distúrbios circulatórios, incluindo vazamento plasmático, hemoconcentração e trombocitopenia (SWAMINATHAN; KHANNA, 2013).

2.7.3. Dengue síndrome do choque- SCD

SCD é definido como FHD acompanhada por um pulso instável, rápido e fraco, com pressão de pulso estreita (<20 mm de Hg), pele fria e úmida, dor abdominal intensa, vômitos persistentes e agitação. O agravamento do quadro de choque pode trazer danos a múltiplos órgãos, além de coagulação intravascular disseminada que juntos são responsáveis por uma alta taxa de mortalidade associada ao SCD. O paciente pode morrer dentro de 12-24 h depois de entrar em choque e pode se recuperar rapidamente com terapia de reposição de volume (GURUGAMA *et al.*, 2010; ROCHE; GOULD, 2013; SHIVPURI *et al.*, 2011).

2.8. PREVENÇÃO E TRATAMENTO

Atualmente não há antivirais eficazes disponíveis para o tratamento da dengue (PANG, 2016). Práticas clínicas atuais se baseiam principalmente na administração de paracetamol e fluidos isotônicos intravenosos, acompanhamento rigoroso da glicose e dos níveis de plaquetas no sangue (WHO 2015). O monitoramento e a avaliação do fluxo intenso de plasma são vitais. Como a fisiopatologia da dengue envolve um aumento na permeabilidade vascular, é necessária uma rápida reposição de fluidos - no entanto, a reposição de fluidos em excesso pode levar a hipervolemia, edema pulmonar e dificuldade respiratória. Este é um aspecto a ser cuidadosamente avaliado e observado principalmente em pacientes idosos, devido alterações cardiovasculares, complacência pulmonar e alterações renais, resultando em complicações clínicas (BRASIL, 2013; HALSTEAD *et al.*, 2007; WHO 2009).

2.8.1. Controle vetorial

A história tem mostrado que as medidas de controle vetores podem ser eficazes na redução de doenças virais transmitidas por artrópodes (GUBLER, 1989; GUZMAN *et al.*, 2006; KOURÍ *et al.*, 1998; SOPER, 1967). Os métodos de controle vetorial envolvem abordagens de manejo ambiental, químico e biológico. No entanto o tratamento com inseticida e nebulização não conseguiram produzir a contenção esperada da doença, devido ao alto custo e eficácia limitada (LACROIX *et al.*, 2012). Uma preocupação crescente é a resistência aos inseticidas apresentada por alguns espécimes vetores da dengue, e os problemas ambientais decorrentes da utilização de produtos químicos potencialmente tóxicos (BISSET *et al.*, 2011; GUPTA; BALLAN, 2014).

Uma abordagem alternativa envolve infectar *A. aegypti* com a bactéria *Wolbachia*. Estudos iniciais sugerem que isto reduz o tempo de vida adulta do mosquito em até 50%. Insetos infectados por *Wolbachia* transmite-os transovarialmente para a próxima geração. Reduzindo assim o tempo de vida do mosquito, a competência viral do vetor e a eficiência de transmissão de vírus, uma redução significativa de *A. aegypti* deve ser observada. Outra característica importante de *Wolbachia* é a sua capacidade para induzir a resistência a uma

variedade de agentes patogênicos, incluindo DENV, nos insetos hospedeiros (LU *et al.*, 2012).

Outras estratégias que envolvem mosquitos geneticamente modificados também estão em desenvolvimento. A mais avançada destas, consiste em liberar insetos portadores de um alelo letal dominante (RIDL) e procura eliminar as populações de vetores, onde machos portadores do gene modificado tornam a sua descendência não viável. Essa construção induz toxicidade celular especificamente nos músculos de vôo de pupas fêmeas, resultando em fêmeas adultas que são incapazes de voar (Fu *et al.*, 2010; outra induz letalidade na fase de larva ou pupa tardia) (PHUC *et al.*, 2007). Ensaios de estirpes de mosquito RIDL foram realizados nas Ilhas Cayman, Brasil e Malásia pela empresa Oxitec, com redução da população de mosquitos em 95%, relatada no campo brasileiro (CARVALHO *et al.*, 2015; HARRIS *et al.*, 2011; HARRIS *et al.*, 2012; LACROIX *et al.*, 2012).

2.8.2. Desenvolvimento de Antivirais

Embora não esteja disponível nenhum agente terapêutico antiviral aprovado para tratar indivíduos que apresentem sintomas de dengue, vários potenciais inibidores deste vírus estão sendo estudados e podem ser considerados para posterior desenvolvimento (GOULD *et al.*, 2008; LIN; CHEN, 2016; KINNEY *et al.*, 2005; RAY; SHI, 2006; STEIN *et al.*, 2008; TALARICO *et al.*, 2005).

Os vírus da dengue fornecem uma variedade de alvos potenciais onde podem agir os inibidores da infecção/replicação. O ideal seria a descoberta de fármacos que tivessem sítios de ações diferenciados, podendo agir em diferentes alvos do processo de infecção e replicação do vírus. Uma das principais limitações é a falta de um modelo animal adequado para simular o estado grave da doença, FHD e SCD, e assim poder observar a ação de antivirais nessas determinadas condições (LIN; CHEN, 2016).

2.8.3. Vacinas

As vacinas são as principais abordagens preventivas no combate a doenças infecciosas. O desenvolvimento de vacinas contra o DENV está em curso há mais de 70 anos (SABIN; SCHLESINGER, 1945). Devido à prevalência simultânea de quatro sorotipos diferentes, uma vacina contra a dengue deve proporcionar proteção a longo prazo para infecções de sorotipos homotípicos e heterotípicos.

Além da vacina Dengvaxia já licenciada em alguns países, vários candidatos à vacina contra a dengue estão em estudos clínicos ou sob avaliação pré-clínica, e várias estratégias têm sido exploradas para o desenvolvimento de vacina (tabela 2). Diferentes estratégias convencionais para produção de vacinas tais como as vacinas multivalentes atenuadas, quiméricas, de DNA e inativadas, vem sendo utilizadas visando à prevenção da infecção de todos os quatro sorotipos do dengue em seres humanos, estimulando predominantemente a imunidade contra os vírion do DENV ou as proteínas de envelope expostas na superfície viral. Contudo, as evidências atuais dos ensaios clínicos indicam que estas vacinas apenas possibilitam uma proteção parcial contra a infecção por DENV em seres humanos (KHETARPAL; KHANNA, 2016).

Tabela 1- Atuais candidatas a vacina da Dengue em diferentes fases de ensaios clínicos

Tipo da Vacina	Desenvolvedor	Fase
Vacina quimérica febre amarela-dengue (CYD)	Sanofi Pasteur	Licenciada
Quimera intertípica- DENVax	CDC-Inviragen/Takeda	III
Mutagênese baseada em LAV-TetraVax-DV	NIH	III
LAV baseado em cultura celular	WRAIR-GSK	II
Vacina inativada purificada-TDENV-PIV	WRAIR-GSK	I
Vacina de subunidade recombinante- V180	Hawaii Biotech, Merck and Co.	I
A vacina de DNA que expressa as proteínas prM e E	Naval Medical Research Centre, WRAIR	I

Adaptado de KHETARPAL; KHANNA, 2016.

2.8.3.1. Vacinas atenuadas vivas da dengue

As vacinas vivas atenuadas, que contêm microorganismos patogênicos atenuados, são capazes de produzir uma ampla gama de respostas imunitárias. De fato, a estratégia de vacinação da atenuação do vírus tem sido utilizada com sucesso no desenvolvimento de várias vacinas de flavivírus, tais como o vírus da encefalite japonesa SA-14-14-2 e as vacinas atenuadas do vírus da febre amarela 17D (YU, 2010; MONATH, 2008). No entanto, o desenvolvimento de vacinas atenuadas para o DENV ainda não foi bem sucedida na prevenção de doenças. Vários destes candidatos à vacina estão em via de serem submetidas a ensaios clínicos.

2.8.3.2. Vacinas quiméricas vivas da dengue

A vacina Dengvaxia é uma vacina quimérica tetravalente e a primeira vacina licenciada no mundo para a prevenção da dengue (CONSTENLA *et al.*, 2016). Desenvolvida pela Sanofi Pasteur, foi concedida a autorização para a comercialização desta vacina em vários países (Lyon, França) (CONSTENLA *et al.*, 2016; HADINEGORO *et al.*, 2015).

Essa vacina se mostrou geneticamente e fenotipicamente estável, em estudos pré-clínicos e de fase I, apresentando-se segura com viremia relativamente baixa (GUIRAKHOO *et al.*, 2004; MORRISON *et al.*, 2010). Em estudo de fase II na Tailândia essa vacina mostrou-se altamente eficaz contra sorotipos DENV3 e DENV4, com proteção modesta contra DENV1. No entanto, não ofereceu quase nenhuma proteção contra DENV2 (SABCHAREON *et al.*, 2012).

Recentemente, dois estudos de eficácia de Fase III de grande escala têm sido conduzidos em áreas endêmicas da América Latina e Ásia. A eficácia da vacina específica para o sorotipo DENV1 foi de 50,3%, 42,3% para DENV2, 74,0% para DENV3 e 77,7% para DENV4 em cinco países latino-americanos endêmicos (VILLAR *et al.*, 2015). Na região da Ásia-Pacífico, a eficácia da vacina média estimada foi de 56,5%, com o seu maior impacto na prevenção de

sintomas clínicos relacionados com dengue grave e hospitalização (CAPEDING *et al.*, 2014).

Semelhante ao estudo de fase II na Tailândia, a eficácia específica do sorotipo de vacina para DENV2 não foi estatisticamente significativa (CAPEDING *et al.*, 2014). Além disso, um estudo de acompanhamento recente de longo prazo de 35 000 crianças entre as idades de 2 e 16 anos de idade na Ásia-Pacífico e países latino-americanos, relataram um aumento da incidência inexplicada de hospitalização por dengue grave entre as crianças com idade inferior a 9 anos (HADINEGORO *et al.*, 2015).

Além da vacina Dengvaxia licenciada, outra vacina tetravalente contra a dengue (TDV), desenvolvida pela Takeda, é uma vacina quimérica contra o dengue. A segurança e imunogenicidade da TDV foram demonstradas através de fase I em ensaios independentes nos Estados Unidos e em uma região não endêmica de dengue da Colômbia (OSORIO *et al.*, 2014). Uma avaliação adicional do estudo clínico de fase II ainda está em processo na Ásia e na América Latina (SIRIVICHAYAKUL *et al.*, 2016).

2.8.3.3. Vacinas inativadas contra a dengue

Em comparação com as vacinas vivas contra a dengue, a vacina tetravalente inativada é mais segura e desencadeia respostas imunológicas que são fáceis de equilibrar contra os quatro sorotipos após a imunização. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina de dengue inativada é represado por uma baixa imunogenicidade e pela falta de respostas imunitárias às proteínas não estruturadas.

A vacina inativada purificada tetravalente com o vírus da Dengue (TDEN PIV) está atualmente sendo avaliada conjuntamente por Glaxo Smith Kline (Londres, RU) e o Instituto de Pesquisa do Exército Walter Reed (Silver Spring, MD, EUA). Em estudo clínico de fase I nos Estados Unidos a imunogenicidade da TDEN PIV foi reforçada por alguns adjuvantes para satisfazer a exigência de proteção a longo prazo. Avaliação da segurança e imunogenicidade da TDEN PIV

em adultos porto-riquenhos foi programada para começar no final de 2016 (CLINICALTRIALS, 2014).

2.8.3.4. Proteínas recombinantes, DNA e subunidades de vacinas contra dengue

Uma vacina tetravalente com antígenos recombinantes incluindo quatro domínios DENV EDIII foi eficaz na neutralização dos quatro sorótipos do DENV e na indução de respostas imunes de memória (BLOCK *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2009; LENG *et al.*, 2009). Contudo os anticorpos específicos-EDIII não constituem uma parte importante dos anticorpos contra dengue no soro dos pacientes e só contribuiu para uma pequena proporção da neutralização DENV *in vitro* (MIDGLEY *et al.*, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2012). Por isso, a eficácia desta vacina precisa de ser adicionalmente validada.

A V180 é uma vacina de subunidade recombinante com base na proteína E desenvolvida pela Merck (Darmstadt, Alemanha). Esta vacina está atualmente em ensaio de fase I para testar a sua segurança e imunogenicidade com e sem adjuvantes (COLLER *et al.*, 2011). Além disso, o Medical Research Center US Naval desenvolveu uma vacina de DNA tetravalente, que é composta de DNA plasmidial que codifica os genes *prM* e *E* dos quatro sorotipos do DENV, com o adjuvante Vaxfectina (BLAIR *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2003; RAVIPRAKASH *et al.*, 2000, 2001).

2.9. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

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

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

Várias técnicas/ferramentas de laboratório convencionais estão disponíveis para o diagnóstico da dengue. A confirmação da dengue pode ser feita através do isolamento do vírus, amplificação do genoma, bem como a detecção de antígenos e anticorpos através de sorologia (PARKASH; SHUEB, 2015).

É importante considerar o período da doença em que o paciente se encontra (**figura 13**) e através disso decidir qual o tipo mais apropriado de teste a ser utilizado e fazer uma correta interpretação dos resultados obtidos (KAO *et al.*, 2005). Por causa da presença da febre e mal-estar, os pacientes procuram atenção médica dentro de dois dias após o início dos sintomas. Nesse estágio, o diagnóstico é possível apenas pela detecção do RNA viral ou pela presença de proteínas do vírus da dengue no sangue. O diagnóstico sorológico não é possível até passar o período febril, porque nesta fase não são detectados os anticorpos IgM e IgG no sangue (GUZMÁN; KOURI, 2004; HALSTEAD, 2007).

Em segundo lugar, exige instalações de laboratório adequadas com pessoal bem treinado. Terceiro o baixo nível de título do vírus no soro ou de sangue não é adequado para realizar a cultura viral (TELES *et al.*, 2011). Por fim, a janela ótima para a cultura do vírus é limitada a 0-7 dias após o início dos sintomas (ATIAS *et al.*, 2009; TANG; OOI *et al.*, 2012). Portanto, apesar de ser o padrão-ouro para a identificação da infecção por dengue, esta abordagem não é prática nos laboratórios de rotina de diagnóstico.

2.9.2. Amplificação do Ácido Nucléico

Detecção do DENV por amplificação de ácido nucléico utilizando transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é sugestivo de uma infecção aguda (KONG *et al.*, 2006). Esse método pode ser usado para identificar o sorotipo específico. Esta técnica proporciona várias vantagens quando combinado com a tecnologia em tempo real, rápido, sensível e específico que permite a detecção do vírus em pequenas quantidades do soro do paciente durante o período de viremia. São usados oligonucleotídeos iniciadores específicos para os sorotipos do DENV (KONG *et al.*, 2006; LANCIOTTI *et al.*, 1992; MALAVIGE *et al.*, 2004). Todavia, o teste de RT-PCR é caro e exige equipamento especializado e pessoal bem treinado, assim, limitando seu uso em muitos países em desenvolvimento (CAVALCANTI *et al.*, 2012; FRY *et al.*, 2011).

2.9.3. Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos são amplamente utilizados para a detecção de infecções de dengue em países com limitados recursos, pois são baratos e fáceis de manusear. Entretanto, a aplicabilidade dos testes sorológicos em áreas endêmicas de dengue deve ser avaliada. Em relação a possibilidade de reatividade cruzada com outros flavivírus circulantes (TRAN *et al.*, 2006). Estes testes incluem ensaio de inibição da hemaglutinação (HI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de imunoglobulina M (IgM) e anticorpos de imunoglobulina G (IgG).

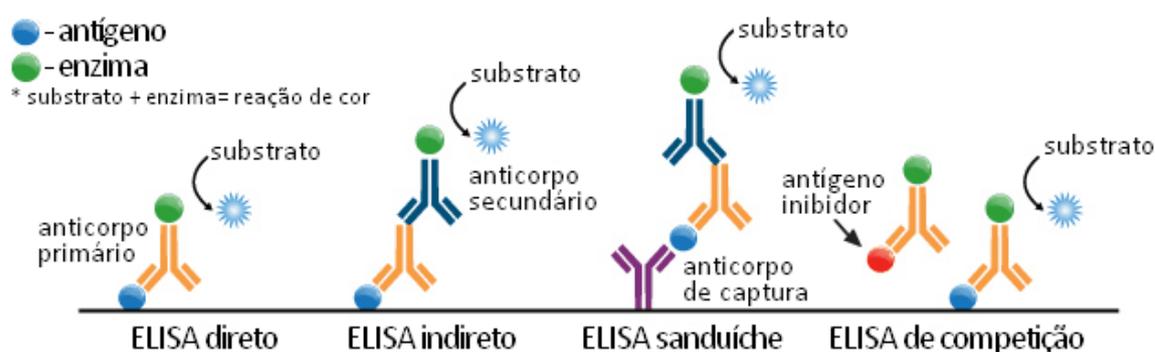
2.9.3.1. Ensaio Hemaglutinação

Este teste costumava ser muito popular e era considerado como padrão-ouro para o diagnóstico da dengue. O princípio deste teste baseia-se na capacidade da proteína do envelope de dengue em aglutinar os glóbulos vermelhos. Os anticorpos anti-dengue presentes nos soros infectados com dengue inibi essa aglutinação e a extensão dessa inibição é medida no teste de hemaglutinação (WHO, 2009). O teste foi desenvolvido comercialmente em um kit sorológico simples, rápido, sensível e específico. Contudo, o teste foi substituído eventualmente por um método com base em ELISA, para a detecção de anticorpos IgM e IgG, específicos de dengue, devido às suas inúmeras limitações práticas (SHU; HUANG, 2004; SUBEDI *et al.*, 2014.).

2.9.3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA

A técnica baseia-se na imobilização da reação antígeno-anticorpo em um suporte sólido, seguida de uma reação colorimétrica (BRUM; WEIBLEN, 2007). Os testes de ELISA podem ser classificados em diretos, indiretos e sanduíche (**figura 14**).

Figura 14- Os principais tipos de ELISA



Nota- No ELISA direto, a placa é sensibilizada pelo antígeno e depois há a incubação com anticorpo marcado. ELISA indireto, os poços são revestidos com antígenos, depois incubado com o primeiro anticorpo que pode ser um soro-teste e em outra etapa é adicionado um segundo anticorpo conjugado, esse tipo de teste foi o utilizado nesse estudo. ELISA de captura, a placa é revestida com um anticorpo, depois adicionado o antígeno e em duas etapas distintas, primeiro é adicionado o anticorpo primário (ou soro teste) e depois o secundário marcado. ELISA de bloqueio ou competição, em que a presença de anticorpos em determinado soro é revelada pela competição com um anticorpo específico (mono ou policlonal) dirigido contra o antígeno. Em todos os tipos em seguida é adicionando o cromógeno/substrato e depois de feita a revelação segue-se a leitura no fotocolorímetro. Fonte: Thermo Scientific, ELISA technical guide and protocols, 2010.

O teste sorológico por ELISA é o principal método de diagnóstico utilizado para o diagnóstico da dengue, sendo considerado o método padrão preconizado pela Organização Mundial da Saúde e adotado pelo Ministério da Saúde no Brasil (BRASIL, 2005). O imunoensaio recomendado é o ELISA de captura de IgM. Essa abordagem em geral apresenta alta sensibilidade e especificidade, no entanto, as dificuldades envolvendo a técnica, como longo tempo na preparação das reações, longas incubações, grande dispêndio de antígeno/anticorpo, são fatores limitantes que destacam a necessidade da incorporação de uma nova tecnologia para o diagnóstico da doença (WONG *et al.*, 2004). Os testes de ELISA também podem ser utilizados para determinar se a infecção é primária ou secundária, através da relação IgM/IgG (KUNO *et al.*, 1991; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1999; SHU; HUANG, 2004).

No Brasil, o kit da PanBio Diagnostics® (Austrália) é utilizado nos laboratórios públicos de diagnóstico, e o custo das reações acaba sendo elevado devido às taxas de importação. Além disso, a hiperendemicidade e o grande número de casos de dengue reportados no país destacam a urgência no desenvolvimento de kits de diagnóstico nacional, sensível e específico (HUNSPERGER *et al.*, 2009).

Detecção de Anticorpo de Imunoglobulina M (IgM)

A detecção de anticorpos IgM específicos de dengue é uma ferramenta de diagnóstico útil em países com recursos limitados (PEELING *et al.*, 2010). Durante a infecção primária por DENV, o anticorpo IgM é o primeiro isotipo de imunoglobulina a aparecer enquanto o anticorpo IgG aparece após alguns dias do aparecimento de IgM. Em contraste, durante a infecção DENV secundária, anticorpos IgG é a primeira a aparecer após o início dos sintomas, enquanto anticorpos IgM aparecem depois de alguns dias em baixo título ou mesmo não detectável em alguns pacientes (ATIAS *et al.*, 2009). Por conseguinte, a presença de IgG e baixos níveis de IgM durante a infecção secundária muitas vezes obstruem o diagnóstico preciso quando se utiliza ELISA direto de IgM.

Consequentemente, ensaios de captura de IgM de dengue (MAC-ELISA) foram concebidos para superar a competição de ligação ao antígeno entre IgG e IgM e MAC-ELISA tornou-se agora um método amplamente utilizado para a detecção de anticorpos IgM anti-DENV (WHO, 2011). Este método mostra uma sensibilidade e uma especificidade de 90% e 98%, respectivamente, em amostras colhidas após a soroconversão (GUZMAN *et al.*, 2010, NUNES *et al.*, 2011).

O ELISA de captura de IgM- (MAC-ELISA) é um exame útil para a vigilância porque requer somente uma amostra de soro na maioria dos casos, além de ser simples e rápido (GUBLER, 1998; GUZMÁN; KOURI, 2004). Um recente problema no diagnóstico sorológico preciso tem sido a reação cruzada em regiões que convivem com outras arboviroses (DURAND, 2005).

Detecção do anticorpo IgG

O ELISA IgG específico para dengue é introduzido como uma alternativa ao ensaio de hemaglutinação. O ELISA de captura de IgG de dengue (GAC-ELISA) é o formato mais comumente empregado, além do método indireto de detecção de IgG ELISA. O ensaio ELISA de IgG utiliza antígeno viral polivalente semelhante ao MAC-ELISA. O teste de avididade de IgG pode ser utilizado para classificar entre a infecção de dengue primária e secundária no soro do doente. Este teste de avididade baseia-se no princípio de que os primeiros anticorpos produzidos após infecção primária exibem avididade (afinidade de ligação) a antígeno mais baixo do que os produzidos depois (PEELING *et al.*, 2010; PRINCE *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2004).

O ELISA de IgG oferece várias vantagens tais como rapidez, facilidade de realização, adequado para estudos de vigilância em grande escala (CORDEIRO *et al.*, 2009). Contudo, semelhante ao teste hemaglutinação, o ensaio ELISA baseado em IgG exibe a mesma reatividade cruzada larga com outros flavivírus circulantes. Além disso, esse método não consegue identificar o sorotipo infectante (PEELING *et al.*, 2010).

Detecção de antígeno DENV NS1

O NS1 de dengue circulante nos soros pode ser detectado utilizando de ELISA. Alguns kits fabricados por diferentes empresas estão disponíveis no mercado, embora a sensibilidade e a especificidade variem entre eles. Um grande número de estudos têm avaliado a sensibilidade e especificidade desses testes de ELISA NS1-DENV disponíveis comercialmente (LIMA *et al.*, 2010, MUHAMMAD *et al.*, 2016).

A desvantagem é que tais testes não diferenciam entre os sorotipos de dengue, pois essa proteína é altamente conservada para todos os sorotipos. Além de que, os ensaios citados são mais bem-sucedidos durante a fase aguda da doença e há perda de sensibilidade, com o término do período de viremia (BLACKSELL *et al.*, 2012; HUNSPERGER *et al.*, 2014).

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

2.10. PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Durante o início dos anos 70 se estabeleceu uma revolução na biologia molecular com o surgimento da tecnologia do DNA recombinante. Com esse novo avanço tornou-se possível que o DNA eucariótico fosse propagado em *Escherichia coli* (MORROW *et al.*, 1974 e os produtos funcionais sintetizado a partir de genes heterólogos clonados em plasmídeos bacterianos (RATZKIN; CARBON, 1977; VAPNEK *et al.*, 1977). Embora a clonagem de qualquer gene em qualquer vetor seja viável, a obtenção de um produto funcional a partir da sua expressão não é tão simples, na prática dezenas de coisas podem dar errado. O fraco crescimento do hospedeiro, a formação de corpos de inclusão, a inatividade de proteínas e até mesmo a não obtenção de qualquer proteína são alguns dos problemas frequentemente encontrados (ROSANO, CECCARELLI *et al.*, 2014).

Para se gerar uma proteína recombinante é necessário a obtenção da sequência gênica (DNA) codificante para uma determinada proteína. Após a subclonagem do DNA em vetores de expressão e a introdução do mesmo num sistema de expressão, a proteína desejada é traduzida. Qualidade, funcionalidade, rapidez e eficiência na produção, são consideradas características importantes no momento de se escolher um sistema de expressão apropriado. Há um grande número de sistemas heterólogos disponíveis como bactérias (*Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*), leveduras (*Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), células eucarióticas de mamíferos, aves e de insetos, transfectadas com vetores virais (WALSH, 1998).

Entre os sistemas de expressão eucariotos utilizando, as células de inseto transformadas via baculovírus, têm sido amplamente empregadas e recomendadas para a obtenção de grandes quantidades de proteínas a partir de células eucariotas. Esse sistema se caracteriza também por oferecer diversas vantagens, por exemplo, a capacidade de fazer modificações pós-traducionais, em relação à expressão de proteínas em células procariotas. No entanto, requer o cultivo 'in vitro' de células de inseto, sendo mais exposto à contaminação bacteriana e fungica e o sucesso pode depender de eventos sob os quais não se tem muito controle como a transfecção e a recombinação do vetor e do DNA do baculovírus (HOCHULI, 1992). O sistema de baculovírus provou ser muito útil para a produção de proteínas e glicoproteínas fosforiladas (KOST, 1999) e para a co-expressão de proteínas que interagem.

Porém, quando o interesse é a produção de proteínas de organismos eucariotos, as leveduras destacam-se como hospedeiras alternativas, por serem unicelulares, deterem as vantagens do sistema bacteriano no que diz respeito à facilidade de manipulação e cultivo em escala industrial, além de serem capazes de realizar modificações pós-traducionais adequadas a várias proteínas (CHEN *et al.*, 2003). O sistema de expressão em levedura pode ser uma escolha acertada para proteínas que formam corpos de inclusão em bactérias e para a produção de proteínas associadas a membranas (CEREGHINO; CLEGG, 1999).

A *E. coli* é o sistema de expressão de primeira escolha para a triagem inicial de expressão de uma proteína recombinante, porque estas células podem

ser facilmente manipuladas, cultivadas de forma barata, além de crescerem rapidamente (KHOW *et al.*, 2012; ROSANO; CECCARELLI *et al.*, 2014).

Essas características fazem com que a *E. coli* seja o sistema mais amplamente utilizado para a produção de proteínas recombinantes. Existem vários protocolos, um grande número de plasmídeos de expressão, e de estirpes modificadas que podem ser utilizadas para obter rendimentos elevados de proteínas (ROSANO; CECCARELLI *et al.*, 2014).

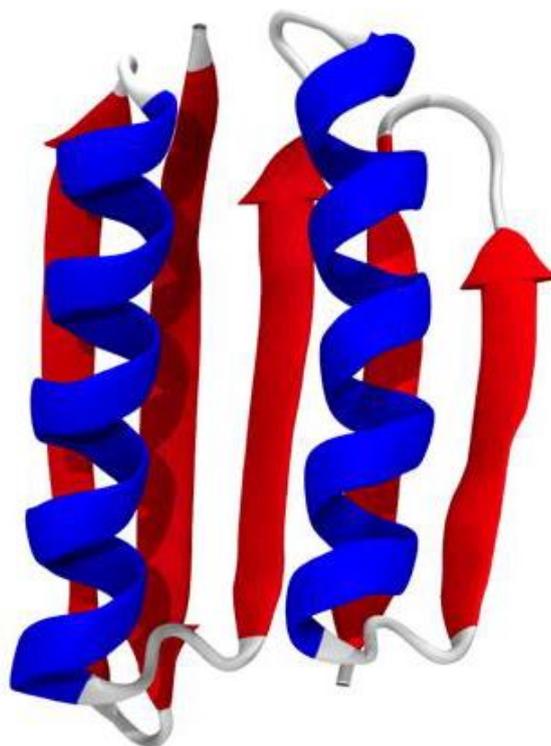
Apesar das numerosas vantagens, a *E. coli* também tem as suas limitações como um sistema recombinante, particularmente a incapacidade de realizar modificações pós-traducionais como a glicosilação, fazendo com que as proteínas recombinantes acumulem-se no citoplasma, ou formem agregados insolúveis (corpos de inclusão), devido a sobrecarga dos mecanismos celulares normais de processamento de proteínas (WEICKERT *et al.*, 1996). Nos últimos anos, novas estirpes, vetores e marcações foram desenvolvidos com a finalidade de contornar essas limitações (KHOW *et al.*, 2012).

2.11. TOP7

A TOP7 é uma proteína artificial com 93-resíduos (**figura 15**), que não existe na natureza e foi projetada em 2003 por Brian Kuhlman e Gautam Dantas, na Universidade de Washington (KUHLMAN *et al.*, 2003). A proteína foi concebida por *ab initio* utilizando métodos computacionais com a ajuda de algoritmos de predição de estrutura de proteínas. A sequência resultante não tinha homologia significativa com qualquer sequência de proteína conhecida. Apesar de possuir uma nova topologia e sequência, a TOP7 demonstrou-se capaz de se dobrar no laboratório e verificou-se ser altamente solúvel e monomérica.

A proteína foi expressa em *E. coli*, purificada e determinada a sua estrutura por cristalografia de raios-X revelando a estrutura predita anteriormente. É composta por um núcleo de folhas betas e duas alfa-hélices que foram chamadas de hélice A (do resíduo 24-41) e hélice B (a partir do resíduo 55-72) e com uma estrutura rígida desprovida de ligações de dissulfetos e glicosilações (KUHLMAN *et al.*, 2003)

Figura 15- Representação da estrutura da proteína sintética TOP7



Nota: Utilizada como proteína carreadora de antígenos NS1- DENV nesse trabalho. Folhas- β estão representadas como setas na cor vermelha, hélices- α como espirais na cor azul e regiões não estruturadas na cor branca.

A proteína nativa é altamente solúvel (25-60 mg/ml) e pode ser produzida em níveis elevados em *E. coli* (~100 mg/l) (KUHLMAN *et al.*, 2003). Mais importante ainda, a proteína TOP7 tem uma estabilidade notável: retém a sua estrutura a altas temperaturas (98°C) e tem uma energia livre de desdobramento de 13,2 kcal/mol a 25°C, sem atividade imunogênica (KUHLMAN *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2010).

Por essas características a TOP7 atraiu grande atenção como um carreador para a engenharia de proteínas (BOSCHEK *et al.*, 2009). Em 2009 Boschek e colaboradores projetaram computacionalmente uma TOP7 quimérica (TOP7 CB1) para ligar especificamente a proteína CD4 humana, inserindo uma sequência peptídica derivada de um anticorpo específico de CD4 na TOP7. Os resultados mostram que esta proteína modificada era capaz de se ligar especificamente CD4 e de acordo com simulações de dinâmica molecular, era extremamente resistente à desnaturação térmica e química (BOSCHEK *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2010).

A TOP7 também foi utilizada para carrear epítopos de HIV. A estratégia era apresentar epítopos 2F5 de HIV em conformação semelhante à nativa. Para isso foram identificadas curtas sequências, regiões mais susceptíveis de serem reconhecidas por anticorpos que foram inseridas ou substituídas em regiões da proteína TOP7. Para selecionar quimeras estáveis estruturalmente foi feito simulações de dinâmica molecular. A análise do dicroísmo circular confirmou a notável estabilidade estrutural do TOP7-2F5. Os candidatos promissores foram produzidos em bactérias e o seu potencial de diagnóstico demonstrando por microarray líquido (VIANA *et al.*, 2013). Os ELISA e a ressonância plasmônica de superfície mostraram uma afinidade superior do pAb 2F5 por TOP7-2F5 ($1,4 \times 10^{-9}$ M) em comparação com os peptídeos, já bem caracterizados, 9-mer ($7,06 \times 10^{-8}$ M) e 23-mer MPER, que é o atual padrão utilizado para diagnóstico de HIV ($1,27 \times 10^{-8}$ M) (VIANA *et al.*, 2016).

Seguindo a mesma estratégia a mesma estratégia de Viana e colaboradores 2013 o presente trabalho com o intuito de expor regiões imunogênicas da proteína NS1 propôs se utilizar a engenharia de proteínas para o planejamento de proteínas quiméricas com potenciais vacinais e/ou de diagnóstico de dengue. Através da estratégia de “*epitope-scaffolding*”, onde elementos estruturais da NS1 foram transplantados para uma proteína aceptora mais robusta (TOP7), conhecida como *scaffold*. Foram selecionadas regiões hidrofílicas da NS1 exposta ao solvente, potencialmente mais imunogênica. Essas proteínas foram avaliadas quanto a estabilidade energética e estrutural por *de novo design* e dinâmica molecular.

O departamento de Virologia da Fiocruz Pernambuco integra o projeto “Instituto Nacional de Inovação em Diagnósticos para a Rede Pública”, que tem como finalidade desenvolver plataformas de diagnóstico e nacionalizar insumos e sistemas de diagnóstico relevantes para a saúde pública brasileira. O presente projeto encontra-se alinhado a este objetivo e seus resultados podem contribuir na elaboração de moléculas alternativas de interesse em diagnóstico e ou vacinal para dengue, a um custo reduzido e com maior eficiência de produção quando comparado aos insumos atualmente utilizados pelo SUS. Assim nesse trabalho foi realizada a otimização de sequências codificantes das proteínas quiméricas

produzidas por métodos computacionais NS1/DENV-TOP7, levando em consideração as sequências dos epítomos da NS1 de isolados do Brasil. Os antígenos foram produzidos em sistema bacteriano e avaliados quanto ao seu potencial imunogênico por ELISA. A produção e validação imunológica são os principais objetivos desse trabalho, visando a produção de moléculas imunorreativas do vírus da dengue com potencial de diagnóstico e ou vacinal.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a antigenicidade de proteínas quiméricas, contendo epítomos de NS1 do vírus da dengue, que foram desenhadas por técnicas computacionais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Otimizar as sequências correspondentes as proteínas quiméricas virais, para a expressão em sistemas bacterianos;

b) Construir vetores procarióticos de expressão, codificando os genes sintéticos, com a finalidade de produzir as quimeras na forma de proteínas de fusão com cauda de histidina;

c) Produzir as quimeras em bactérias e purificá-las através de cromatografia de afinidade;

d) Avaliar a imunogenicidade das quimeras através de ELISA, utilizando painéis sorológicos de referência;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS POR MÉTODOS COMPUTACIONAIS

Através de métodos computacionais, incluindo simulação de dinâmica molecular e *de novo* design, um protocolo global de engenharia de proteínas foi elaborado em parceria com o grupo de Modelagem de Biomateriais - FIOCRUZ/UFPE (figura 16). O protocolo consistiu na seleção de sequências curtas (8 a 13 aminoácidos de comprimento) da proteína NS1 do vírus da dengue. Essas possíveis sequências antigênicas foram inseridas na TOP7 (“scaffold”). As quimeras que se apresentaram energeticamente e estruturalmente mais estáveis foram selecionadas para terem os seus genes sintetizados, expressas e depois feito à caracterização imunogênica por meio de ELISA indireto. Toda a parte computacional foi executada pelo aluno de doutorado Danilo Coelho do programa de pós-graduação em Química da UFPE.

Figura 16- protocolo de engenharia de proteínas



Nota: A metodologia de produção das quimeras conta com uma parte em *silico* onde se fez o desenho racional das mesmas, por meio de ferramentas computacionais com a finalidade de construir quimeras com estabilidade térmica e estrutural, apresentando de forma adequada os antígenos semelhantes à proteína viral nativa. Elaborada toda a parte computacional os antígenos passaram a ser validados por ELISA indireto.

4.1.1 Seleção das Sequências da NS1

Para as construções quimeras NS1/DENV-TOP7, regiões hidrofílicas foram selecionadas a partir da sequência primária de aminoácidos da NS1 DENV-1, que por tendência estão mais expostas ao solvente e assim passíveis de serem reconhecidas por anticorpos anti-NS1. Para a identificação dessas sequências foi utilizado à análise de hidropatia de Kyte-Doolittle (JOHNSON *et al.*, 2014; KYTE; DOOLITTLE, 1982).

4.2. OTIMIZAÇÃO DOS GENES PARA EXPRESSÃO EM SISTEMA BACTERIANO

Os genes correspondentes às proteínas quiméricas, selecionadas ao final das análises computacionais, foram otimizados e sintetizadas comercialmente pela GenScript para expressão em *E. coli* da linhagem BL21 Star (DE3) (Invitrogen). Foram otimizadas algumas características de interesse, como *codon usage*; estrutura secundária do RNA mensageiro (RNAm); motivos repetitivos de DNA, distribuição do conteúdo de guanina (G) e citosina (C); sítios críticos de *splicing*, sequências longas repetitivas de DNA, presença/ausência de sítios específicos de restrição, objetivou permitir um aumento significativo nos níveis de expressão das proteínas virais em células procarióticas, além de permitir as estratégias de clonagem previamente estabelecidas.

As sequências otimizadas foram fusionadas a dois sítios múltiplos de clonagem: 5' (*Nco I* e *Nhe I*) e 3' (*Xho I* e *Hind III*), que permitem a clonagem do gene de interesse, em diferentes vetores de expressão, através de estratégias de subclonagem. Desta maneira as sequências dos genes foram otimizados, flanqueadas pelos sítios múltiplos de clonagem e enviadas para o laboratório clonadas no vetor pUC57-Simple (GenScript), em seguida subclonadas no vetor de expressão pRSETA (Invitrogen).

4.3. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO PRSETA (INVITROGEN)

4.3.1. Preparação de células competentes

Bactérias *E. coli*, linhagens NEB5 α (utilizadas para clonagem gênica) e BL21 *Star* (DE3) (utilizadas para expressão proteica), ambas obtidas através da

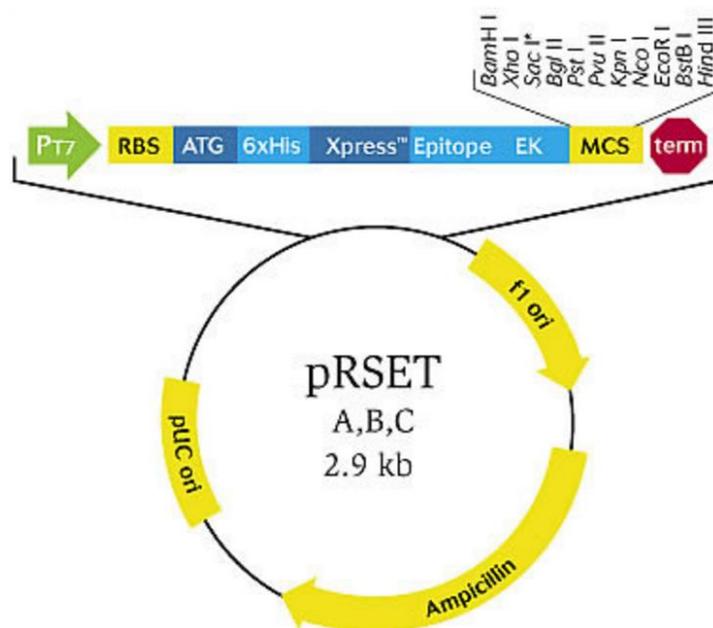
companhia Invitrogen, foram tornadas quimicamente competentes para a recepção de DNA plasmidial através de tratamento a base de cátions bivalentes (cálcio, Ca^{++} e magnésio, Mg^{++}). Uma colônia de cada linhagem celular foi inoculada em cinco mililitros (ml) de meio Luria Bertani (LB) (1% triptona,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

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

4.3.2. Preparação do vetor de expressão pRSETA (Invitrogen)

O vetor pRSETA, um vetor pUC-derivado, (**figura 17**), foi o utilizado neste trabalho. Os insertos de DNA foram posicionados logo após, e em fase, com uma sequência que codifica um peptídeo de fusão N-terminal, que, entre outros elementos, possui uma região com seis histidinas (His) que, na proteína traduzida, funcionará como domínio de ligação ao metal níquel, permitindo simples purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade. A expressão do gene de interesse é controlada pela ação do promotor T7, reconhecido especificamente pela T7 RNA polimerase, através da ação do indutor de expressão isopropil β -D-tiogalactosídeo (IPTG).

Figura 17- O vetor pRSETA



Nota: possui o forte promotor T7, o sítio de ligação ao ribossomo (*Ribosome Binding Site* – RBS) e o códon de iniciação da expressão adenina-timina-guanina (ATG). Tem um total de 2897 nucleotídeos, contendo um gene que confere resistência a ampicilina (AMP, marcador de seleção). As seis His da porção N-terminal permitem a purificação da proteína de fusão em cromatografia de afinidade com resinas com íons metálicos, como o níquel, além de favorecer a detecção da proteína com o uso de anticorpos anti-His. Fonte: INVITROGEN, 2016.

Uma alíquota de 50 µl de células competentes NEB5α, com eficiência de $2,5 \times 10^5$ colônias por µg de DNA foi transformada por choque térmico e 1 µg do vetor pRSETA (no gelo por 30 min, depois 4 min. a 42°C). Em seguida as bactérias foram semeadas em placa de meio LB sólido suplementado com ampicilina (LB/AMP) na concentração de 100 µg/µl. Clones isolados foram selecionados de cada placa para a extração de DNA plasmidial, em média escala, utilizando o kit QIAprep Spin Midiprep (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a extração e quantificação através de nanofotômetro (Implen), o plasmídeo purificado obtido foi submetido à clivagem com a enzima *Nhe* I (*New England Biolabs*), em uma reação com volume final de 50 µl contendo: 1x tampão de clivagem, 5 µg do vetor e 5 unidades (U) da enzima. A clivagem foi realizada a 37 °C, durante 6 h, e os produtos da clivagem foram visualizados em gel 1% agarose corado com brometo de etídio. Em seguida foi realizado uma segunda clivagem, e para isso foram adicionados 1x tampão de clivagem e 5 U da enzima *Nco* I (*New England Biolabs*), seguido por incubação a 37 °C por 6 h. Para

confirmar a clivagem do vetor, os fragmentos obtidos foram fracionados junto ao DNA intacto (não linearizado) para comparação relativa de peso molecular em gel 1% agarose corado com brometo de etídio. O vetor linearizado foi, em seguida, purificado utilizando o kit comercial QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante, e quantificado por espectrofotometria.

4.4. PREPARAÇÃO DOS VETORES CONTENDO OS GENES OTIMIZADOS

As sequências gênicas otimizadas das proteínas das quimeras foram sintetizadas comercialmente e enviadas ao laboratório em plasmídeos pUC57-Simple (GenScript). Esses plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias NEB5 α quimicamente competentes por choque térmico (no gelo por 30 min, depois 4 min. a 42°C). As reações de transformação continham 50 μ L de células competentes e 1 μ g do DNA pUC57-Simple (GenScript). Clones isolados foram selecionados de cada uma das construções e foram realizadas extrações de DNA plasmidial em pequena escala, utilizando o kit QIAprep Miniprep (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Provas de clivagem enzimática dos genes foram realizadas para confirmar a identidade dos clones. As reações de digestão foram realizadas com as enzimas *Nhe I* e *Hind III* (Biolabs Inc.), com volume final de 50 μ L cada, contendo: 1X tampão de digestão, 8 μ g de cada vetor e 8 U de cada enzima. As digestões foram realizadas a 37 °C, durante 4 horas. Os produtos das digestões foram fracionados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e a identidade de cada sequência foi analisada através do padrão de bandas gerado. Os fragmentos relativos a cada gene otimizado foram extraídos do gel e purificados utilizando o kit comercial GMXTM PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante, e quantificados por espectrofotometria.

4.5. SUBCLONAGEM DOS GENES OTIMIZADOS NO VETOR PRSETA DE EXPRESSÃO BACTERIANA

Os genes sintéticos purificados foram subclonados no vetor pRSETA, utilizando o cassete de clonagem inserido na síntese comercial dos genes e sítios enzimáticos preexistentes no vetor. As reações de ligação entre o vetor e cada

um dos genes otimizados, previamente purificados, foram realizadas utilizando duas quantidades diferentes dos fragmentos referentes aos genes sintéticos (1 e 5 µl), mantendo uma concentração definida do vetor (100 ng/reação). O volume final da reação foi de 10 µl em ambos os casos: 1 µl de 10x tampão de ligação, 100 ng do vetor linearizado, 0.4 U de T4 DNA Ligase (*New England Biolabs*) e água deionizada em quantidade suficiente para o volume final de 10 µl. Reações contendo apenas o vetor linearizado, ou seja, sem os fragmentos sintéticos, foram utilizadas como controles negativos da ligação. As reações foram incubadas a 16°C, durante 20 h, e em seguida utilizadas para a transformação de células competentes NEB5α.

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

4.6. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS

Os plasmídeos contendo os genes de interesse foram utilizados para transformar bactérias, quimicamente competentes, da linhagem *E. coli* BL21 *Star* (Invitrogen). Após transformação foram crescidas em meio LB/AMP, para a seleção das células contendo o plasmídeo pRSETA. As células foram submetidas a ensaios de expressão em pequena escala, para avaliar as melhores condições de obtenção das proteínas quiméricas, as colônias isoladas de cada construção foram inoculadas em 3 ml de meio LB/AMP e incubadas a 37 °C, 225 rpm, durante 16 h. Este pré-inóculo foi utilizado para o crescimento em 20 ml de meio LB/AMP, a 37 °C, 225 rpm, até que a cultura atingisse uma OD 600nm de aproximadamente 0.7. Após esse ponto, a expressão das proteínas

recombinantes foi induzida com 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM de IPTG, durante 4 h a 25°C, 30°C e 37°C. O sedimento celular foi coletado por centrifugação a 4°C, 8.000 rpm, por 20 minutos, e ressuspensos em Tampão A [50 mM fosfato de sódio (NaH₂PO₄), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0]. As células foram lisadas através de ultra-sonicação, com seis pulsos de 30 seg, intercalados com um minuto de repouso, e amplitude máxima das ondas ultra-sônicas de 40 kHz. Em seguida, a cada lisado celular foi adicionado 0,01% de Triton-X 100. Os extratos bacterianos foram então homogeneizados e centrifugados a 4°C, 10000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante obtido após centrifugação, contendo o extrato protéico total solúvel em tampão A, foi coletado e armazenado. Os debris celulares, contendo a fração proteica insolúvel em tampão A, foram ressuspensos em 2x tampão de amostra para eletroforese (2x Laemmli). Tanto a fração solúvel quanto a insolúvel foram checadas em gel de SDS-PAGE (15%), a fim de determinar em qual delas encontra-se a proteína expressa e estabelecer a estratégia de purificação.

Após a otimização, as proteínas foram expressas em larga escala as expressões em larga escala foram realizadas a temperatura de 37°C e concentração de 0,5 mM de IPTG, em 500 mL de meio LB contendo 100 mg/mL de ampicilina. Após às 4 h de expressão, os meios foram centrifugados a 10.000 rpm/ 4°C por 10min. Os sedimentos foram ressuspensos em 20 mL de tampão de lise contendo: 50 mM de Tris-HCl, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM e pH 8.0. Os centrifugados bacterianos foram sonicados, usando seis pulsos de 30s cada, com intervalo de 60s entre os pulsos. Os lisados foram então centrifugados a 10.000 rpm/4°C por 10 min, adicionados de 100 µL de Triton-X 100. Os sobrenadantes ou extratos protéicos foram recuperados.

4.7. PURIFICAÇÃO PROTÉICA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A purificação dos antígenos fusionados à cauda de histidina foi realizada através de cromatografia de afinidade em resina de níquel ativada Ni-NTA (Qiagen). As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade. Os extratos protéicos foram incubados por 1h/4°C sob agitação orbital com uma resina de níquel (Ni-NTA Qiagen), previamente equilibrada com tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM). Após

incubação, os sobrenadantes foram removidos e as resinas contendo as proteínas foram lavadas 3x com o tampão (50 mM Tris-HCl pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazole 50 mM). Para eluir as proteínas, as resinas foram incubadas com tampão (50 mM Tris-HCl pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 0.5 M), sob agitação orbital por 30 min a 4 °C e posteriormente centrifugadas a 5.000 rpm/ 4 °C por 2 min. O sobrenadante ou eluato, contendo as proteínas, foram recuperados. A etapa de eluição foi repetida duas vezes em cada purificação.

A quantificação das quimeras expressas foram realizadas através de ensaios de densitometria, utilizando-se como padrão uma curva de Albumina Sérica Bovina – BSA com concentrações previamente estabelecidas. As quantificações foram realizadas através do *programa Kodak Digital Science 1D Image Analysis* (Kodak).

4.8. ENSAIO DE IMMUNOBLOT

Após purificação, as proteínas quimeras foram ressuspensas em tampão 2x Laemmli desnaturante, fracionadas em gel SDS-PAGE (15%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio das membranas em solução 1x PBS-5% leite, as mesmas foram incubadas com os anticorpos anti-histidina tetravalentes na diluição de 1:500 em solução 1x PBS-1% leite, durante aproximadamente 16 horas, sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase na diluição de 1:10.000 (*JacksonImmunoResearch*), durante uma hora sob agitação. As membranas foram lavadas três vezes com 1x PBS-0.05% Tween 20, pH 7.4, e a revelação foi realizada através de quimioluminescência, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.9. AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DENV NS1

4.9.1. ELISA de captura para a proteína DENV NS1

Os ELISA foram realizados com a finalidade de avaliar se as proteínas contendo os epítomos são capazes de ser reconhecidas por anticorpos anti-NS1 de pacientes infectados com DENV da coorte de pacientes do LAVITE. As placas

de ELISA (96 well Flat bottom/Half area - Corning Incorporated) foram inicialmente adsorvidas com 2µg/poço e depois de vários ensaios de otimização utilizado 1µg/ml das proteínas quiméricas. As quimeras foram diluídas em solução 0.1 M de carbonato-bicarbonato de sódio pH 9.6 e incubadas por 16h/4°C. Os poços foram lavados com tampão (0.01% Tween-20 em 1X PBS) três vezes e em seguida a placa foi bloqueada com leite 5% em 1X PBS durante 1h/37°C. Como controle positivo foi utilizado um *pool* de amostras sorológicas de pacientes DENV positivos, diluído em proporção 1:500 e depois se otimizando para 1:50 em tampão de ensaio (leite 1% em 1X PBS) e incubado nos poços durante 1h/37°C. Após lavar com tampão de lavagem, o mAb anti-IgG humano conjugado à peroxidase foi diluído à 1:15.000 e 1:10.000 (concentração otimizada) em tampão de ensaio e incubado nas placas por 1h/37°C. Como controle negativo do ensaio foi utilizado: um controle negativo para NS1 de flavivírus de um kit comercial diluído 1:500 e em ensaios otimizados o controle negativo, um pool de paciente negativos para dengue diluído 1:50. A proteína TOP 7 (*scaffold*) original foram utilizadas, nas mesmas condições das proteínas quimeras, como controle de antígenos e assim verificar a ocorrência de ligações inespecíficas do soros positivos e negativos (anticorpos primários). As absorbâncias resultantes foram medidas utilizando o leitor de ELISA Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System (Bio-Rad) à 450 nm.

4.10. COORTE SOROLÓGICA

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

recolhidas foram testadas para anticorpos anti-DENV IgG para estudar a reatividade cruzada com YFV. Dessa forma, para as amostras desta coorte temos os valores detectados para anticorpos contra ambos os vírus DENV e febre amarela.

4.11. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

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

O presente trabalho foi apreciado e aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança-CTNBio através do parecer de número 4881/2015.

5. RESULTADOS

5.1. SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DA NS1 E OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS POR MÉTODOS COMPUTACIONAIS.

Através do gráfico de hidropatia de Kyte-Doolittle para a para a região 178-352 da NS1 DENV-1 foram selecionados 6 picos negativos (alta solubilidade) correspondentes às sequências da Tabela 3.

Tabela 2- Sequências selecionadas a partir do gráfico de hidropatia.

Epítopo	Sequência	Posição na NS1
1	YWIESEK	200-206
2	TCIWPKSHTLW	222-232
3	GPISQHNYRPGYFT	249-262
4	EHCGNRGPSLR	289-299
5	LRFKGE	321-326
6	VKEKEEN	338-344

Destaque em vermelho para a sequência do epítopo utilizada na construção das quimeras nesse trabalho

As sequências dos epítopos na tabela 1 foram inseridas sem alterar a estabilidade das regiões escolhidas na TOP7 (*scaffold*). No entanto apenas foram consideradas as quimeras estáveis, tanto em termos de energia quanto de estrutura.

Tabela 3- Seleção de proteínas construídas usando a TOP7 (scaffold)

Código	Epítipo	Posição na Top7
1S15-21_Top7	1	15-21
1S16-22_Top7	1	16-22
1S19-25_Top7	1	19-25
1S75-81_Top7	1	75-81
2S20-30_Top7	2	20-30
5S4-9_Top7	5	4-9
5S8-13_Top7	5	8-13
5S13-18_Top7	5	13-18
5S79-84_Top7	5	79-84
7S22-30_Top7	7 ^a	22-30
7S20-28_Top7	7 ^b	20-28
7S51-59_Top7	7 ^b	51-59

^a Foram utilizados apenas os resíduos 230-238

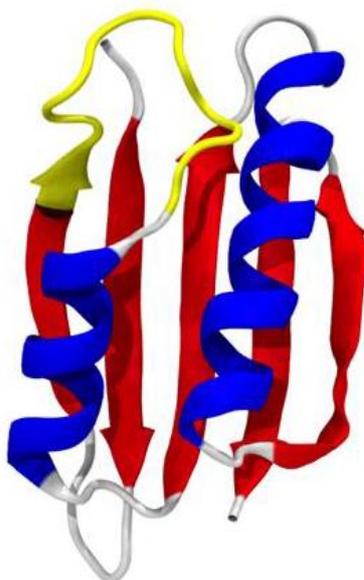
^b Foram utilizados apenas os resíduos 232-240

* Unidade Rosetta score

Destaque em vermelho para a proteína quimérica alvo desse estudo

Dentre as quimeras analisadas que se mostraram estáveis quando comparadas à TOP7 original, está 2S20-230_TOP7, utilizada nesse estudo (figura 18).

Figura 18- Representação das estruturas 2S20-30_TOP7



Nota: Folhas- β estão representadas como setas na cor vermelha, hélices- α como espirais na cor azul e regiões não estruturadas na cor branca. As regiões correspondentes aos epítomos estão destacadas em amarelo.

O DNA da quimera foi sintetizado comercialmente para a expressão e avaliação imunológica. Porém, devido às diferenças entre os sorotipos (tabela 3), foram obtidas sequências de DNA para cada sorotipo (Tabela 4).

Tabela 4- Região conservada 222-232 da NS1 em cada sorotipo.

Sorotipo	Sequência da NS1
DENV-1	222-TCIWPKSHTLW-232
DENV- 2	222-NCHWPKSHTLW-232
DENV-3	222-TC ^T WPKSHTLW-232
DENV-4	222-TCIWPK ^T H ^T TLW-232

As mutações pontuais estão destacadas em vermelho

As sequências de DNA codificantes das proteínas (Tabela 4) foram otimizadas para expressão em *E. Coli* e clonadas em um vetor comercial (PUC57, GenScript®). Estas sequências foram então subclonadas no vetor de expressão pRSET A.

Tabela 5- Sequências de aminoácidos das proteínas expressas em sistema procarioto

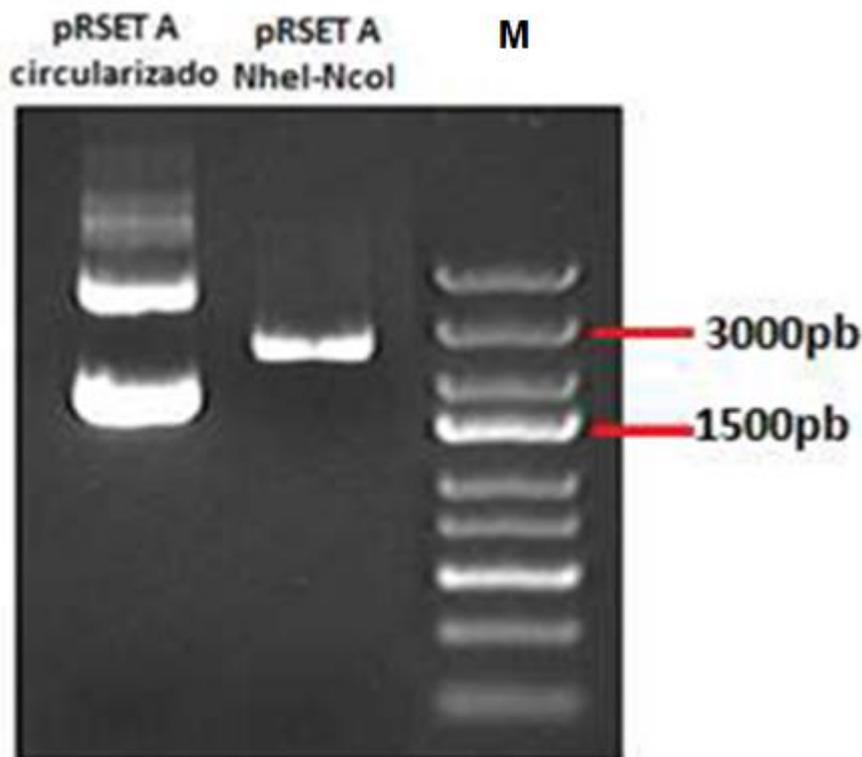
Código	Sequência
2S20-230_Top7_D1	DIQVQVNIDDNGKNFDYTYTVT TCIWPKSHTLWL LQKVLNELMDYIKKQGAKRVRISIT ARTKKEAEKFAAILIKVFAELGYNDINVTFDGDTVTEGQL
2S20-230_Top7_D2	DIQVQVNIDDNGKNFDYTYTVT NC H WPKSHTLWL LQKVLNELMDYIKKQGAKRVRISI TARTKKEAEKFAAILIKVFAELGYNDINVTFDGDTVTEGQL
2S20-230_Top7_D3	DIQVQVNIDDNGKNFDYTYTVT TC T WPKSHTLWL LQKVLNELMDYIKKQGAKRVRISIT ARTKKEAEKFAAILIKVFAELGYNDINVTFDGDTVTEGQL
2S20-230_Top7_D4	DIQVQVNIDDNGKNFDYTYTVT TCIWPK T HTLWLQKVLNELMDYIKKQGAKRVRISIT ARTKKEAEKFAAILIKVFAELGYNDINVTFDGDTVTEGQL

Os epitopos estão destacados em negrito e as mutações pontuais destacadas em vermelho.

5.2. SUBCLONAGEM DOS GENES OTIMIZADOS EM VETOR DE EXPRESSÃO BACTERIANO

Bactérias *E. coli* NEB5 α quimicamente competentes foram transformadas com o vetor pRSETA vazio, e três clones foram selecionados da placa para a preparação de DNA plasmidial. Os plasmídeos obtidos foram submetidos à clivagem sequencial com as enzimas *Nhe* I e *Nco* I, e migradas em gel 1% agarose (**figura 19**). O fragmento vetorial linearizado foi purificado e quantificado por espectrofotometria.

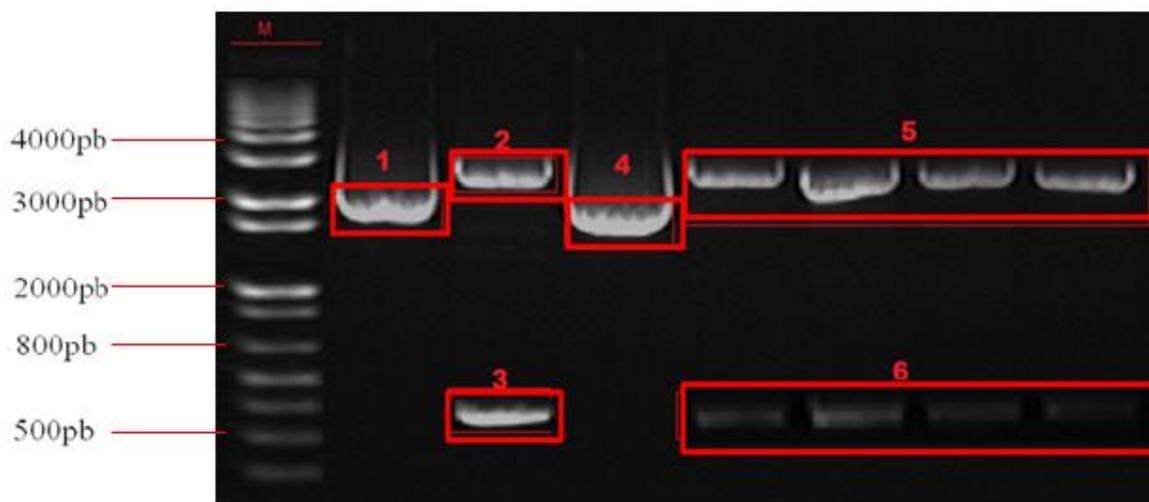
Figura 19- Linearização do vetor pRSETA



Nota: O Vetor pRSETA, tem aproximadamente 2.900 pb e foi submetido à clivagem enzimática sequencial com as enzimas Nhe I e Nco I, visando a sua linearização e preparação para clonagem do gene de interesse. O produto da clivagem foi excisado de gel de 1% agarose corado com brometo de etídio, purificado e quantificado por espectrofotometria (5 µg/µL). O padrão de peso molecular – M utilizado foi o GeneRuler Express (Fermentas).

As sequências otimizadas e sintetizadas comercialmente pela GenScript foram recebidas clonadas no vetor comercial pUC57, um vetor comum de clonagem com 2710 pares de bases (pb). Para confirmação da identidade dos genes, os vetores recebidos foram utilizados para transformar *E. coli* NEB5α e extrações plasmidiais foram preparadas em média escala. Para todos os genes, os fragmentos purificados foram enzimaticamente inseridos em fase de leitura no vetor de expressão bacteriano pRSETA. As reações de ligação foram utilizadas para transformar bactérias competentes *E. coli* NEB5α, e foram preparadas extrações plasmidiais das novas construções. O DNA extraído foi enzimaticamente clivado para conferir a identidade dos genes de interesse, através de migração eletroforética em gel 1% agarose (**figura 20**). Todos os clones liberaram fragmentos de tamanho esperado, confirmando o sucesso das estratégias de subclonagem.

Figura 20- Corrida eletroforética de produtos da digestão do DNA dos Clones selecionados para verificação da clonagem.



1- vetor pRSETA não digerido; 2 e 3- vetor pRSETA.digerido com as enzimas *NcoI* e *NheI*; 4- construção não digerida;5 e 6- A digestão dos clones com as enzimas *NcoI* e *NheI* apresentou as bandas com tamanho 2802 e 307 pb, correspondente ao vetor e o inserto. M- Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). gel de 1% agarose corado com brometo de etídio.

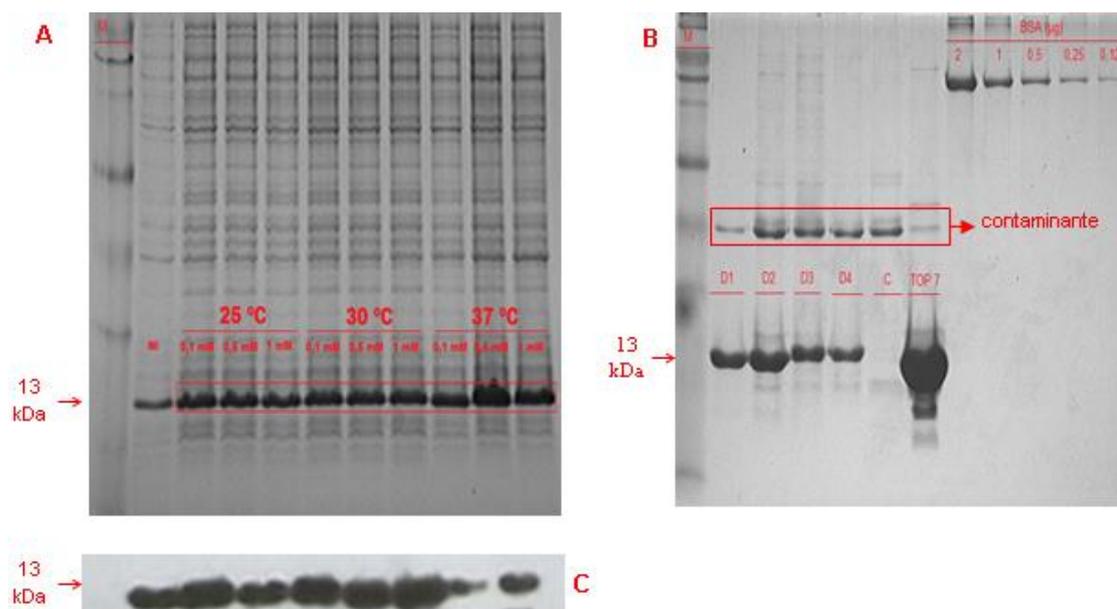
5.3. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS

Os plasmídeos comprovadamente ligados aos genes de interesse foram utilizados para transformar bactérias, quimicamente competentes, da linhagem *E. coli* BL21 *Star* (Invitrogen). Inicialmente foram feitos testes para saber as melhores condições de indução, a cultura de *E. coli* BL21 *star* positiva, contendo os genes heterólogos, foram induzidas com diferentes concentrações de IPTG (0,1, 0,5, e 1 mM) e temperatura (25°C, 30°C e 37°C) bandas com massa molecular de aproximadamente 13 kDa (corresponde ao tamanho da proteína de interesse) foram visualizadas em gel de SDS-PAGE 15%, fortemente expressas em todas as condições (**Figura 21-A**). As proteínas recombinantes se mostraram altamente solúveis durante os testes de solubilidade, realizados para determinar se as proteínas estavam sendo expressas na sua forma solúvel ou em forma de corpúsculos de inclusão.

Uma vez confirmada a expressão em pequena escala, as bactérias transformadas foram novamente inoculadas em meio de crescimento para indução em larga escala e purificação. Após a indução, as culturas foram ressuspensas em tampão de coluna e sonicadas (para a liberação das proteínas citoplasmáticas), e o sobrenadante (contendo o extrato protéico total) foi

aplicado em resina de níquel. Após sucessivas lavagens com tampão A, as proteínas recombinantes foram eluídas com tampão B. Foram coletadas amostras dos passos da purificação e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% e visualizadas por coloração com Azul de Coomassie. Todas as proteínas foram expressas e purificadas com sucesso. As proteínas foram quantificadas através de comparação com uma curva de BSA de diluição padrão, em ensaios densitometria. No entanto o processo de purificação não foi totalmente eficiente para impedir a presença de uma proteína contaminante de *E.coli*, visualizada em todas as amostras da proteína de interesse (**figura 21-B**). Feito um ensaio de expressão com *E.coli* não transformada (vetor vazio) e depois seguindo o mesmo processo de purificação a contaminante continuou presente, mostrando ser uma proteína da própria bactéria (**figura 21-B**).

Figura 21- (A) Teste de condições de expressão em pequena escala, (B) Expressão em larga escala e purificação, (C) *Imunoblot* com anticorpo anti-histidina

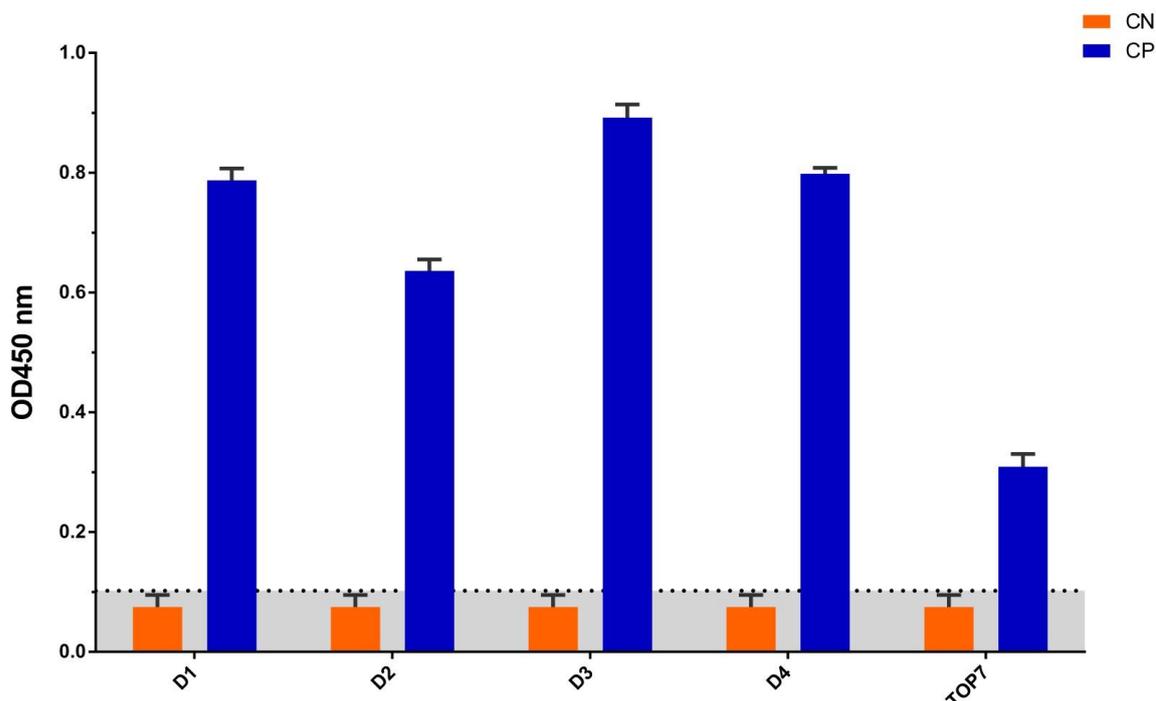


Nota: D1/D2/D3/D4 (2S20-230_TOP7_D1/2S20-230_TOP7_D2/2S20-230_TOP7_D3/ 2S20-230_TOP7_D4/- as quatro quimeras com epítomos NS1/TOP7, TOP7- proteína carreadora nativa e que foi usada como controle nos EIIISA, BSA-curva de BSA para comparação do rendimento proteico. Gel SDS-PAGE 15% corado com azul comassie. Bandas na altura 13kDa correspondendo a proteína de interesse.

5.4. ELISA DE CAPTURA PARA A PROTEÍNA DENV NS1-TOP7

Foram testadas todas as proteínas quiméricas além da própria TOP7. O gráfico (**figura 22**) foi construído no programa Graph Pad Prism, o eixo y representa os valores médios de densidade óptica de 450nm para todos antígenos quantificados e amostras separadas no eixo x por cores referente a identificação dos antígenos distribuídos nas diferente condições que foram submetidos (Blank (branco do ensaio), Controle negativo (CN), Controle Positivo (CP). Todas as quimeras testadas aparentemente foram reconhecidas quando submetidas ao controle positivo e baixo reconhecimento ao controle negativo. A TOP7 apresentou um pequeno *background* ao ser submetido ao controle positivo, (trata-se de ligações inespecíficas vistas também no trabalho de Viana *et al.*, 2013), e todo esse sinal foi utilizado para realizar o *cut off* da quantificação obtida pelas quimeras.

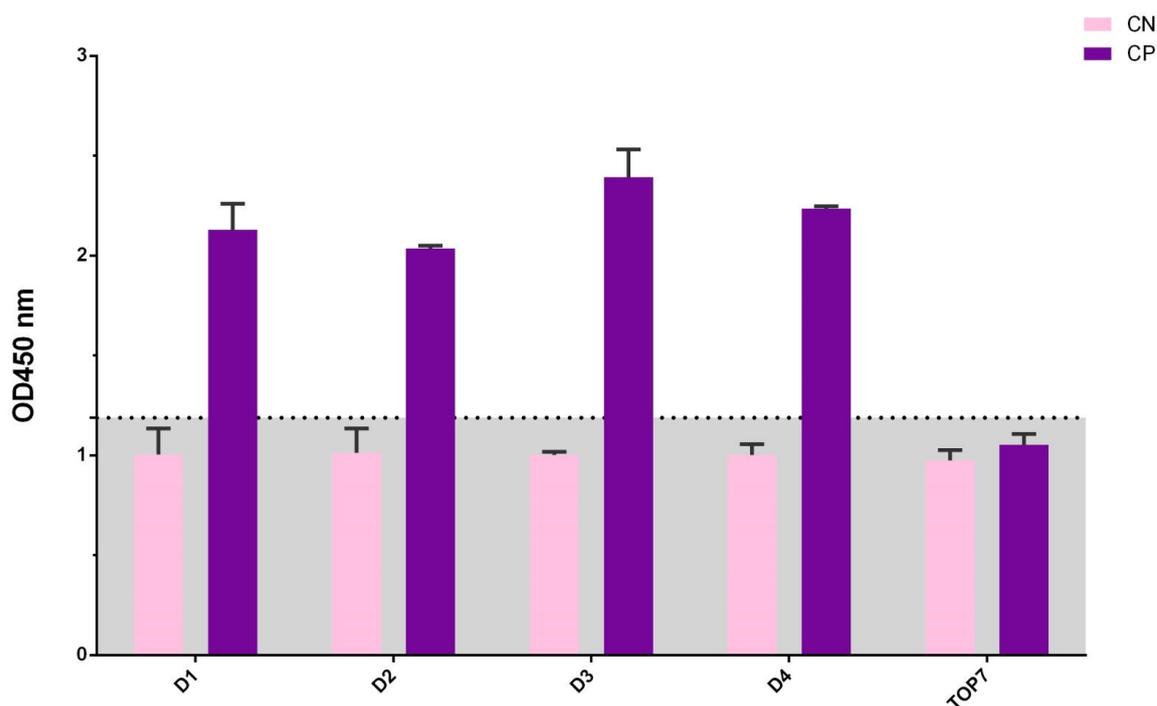
Figura 22- Caracterização antigênica das quimeras NS1-TOP7 por ELISA de indireto



D1 (222-232 _NS1_TOP7_D1), D2 (222-232 _NS1_TOP7_D2), D3 (222-232 _NS1_TOP7_D3), D4 (222-232 _NS1_TOP7_D4), TOP7- proteína carreadora onde os epítomos foram inseridos. A placa foi sensibilizada com 2 µg/poço dos antígenos. CN (laranja)- controle negativo da reação, os antígenos foram submetidos a um soro de kit de diagnostico negativo para flavivírus (diluição 1:500). CP (azul)- controle positivo da reação, os antígenos foram submetidos a soros de pacientes positivos para dengue da coorte do LaVITE (diluição 1:500). Anticorpo secundário (anti-IgG humano- 1: 15000). A linha pontilhada indica o cut-off (média do controle negativo mais 3 vezes o desvio padrão) abaixo do qual foi considerado sem reconhecimento.

Neste outro teste foram modificadas algumas condições com a finalidade de otimizar o sinal de reconhecimento das quimeras, assim como diminuir as ligações inespecíficas apresentada no teste anterior. O gráfico (**figura 23**) foi construído no programa Graph Pad Prism, o eixo y representa os valores médios de densidade óptica de 450nm para todos antígenos quantificados e amostras separadas no eixo x a identificação dos antígenos avaliados. Todas as quimeras testadas aparentemente foram reconhecidas quando submetidas ao controle positivo e baixo reconhecimento ao controle negativo. A TOP7 apresentou um pequeno *background* ao ser submetido ao controle positivo (trata-se de ligações inespecíficas vistas também no trabalho de Viana *et al.*, 2013), e todo esse sinal foi utilizado para realizar o *cut off* da quantificação obtida pelas quimeras.

Figura 23- Caracterização antigênica das quimeras NS1-TOP7 por ELISA de indireto



D1 (222-232_NS1_TOP7_D1), D2 (222-232_NS1_TOP7_D2), D3 (222-232_NS1_TOP7_D3), D4 (222-232_NS1_TOP7_D4), TOP7- proteína carreadora onde os epítopos foram inseridos. A placa foi sensibilizada com 1µg/µl dos antígenos. CN- pool de pacientes negativos para dengue (diluição 1:50). CP- pool de pacientes positivos para dengue (diluição 1:50). Anticorpo secundário (anti-IgG humano- 1: 10000). A linha pontilhada indica o cut-off (média do controle negativo mais 3 vezes o desvio padrão) abaixo do qual foi considerado sem reconhecimento.

6. DISCUSSÃO

A dengue é uma das doenças humanas causadas por flavivírus mais importante em um contexto mundial. Essa doença tem provocado um número enorme de casos, trazendo um ônus importante para a saúde da população mundial provocando elevado quantitativo de óbitos e internações hospitalares, além de altos custos para os governos e sistemas de saúde.

Apesar dos inúmeros esforços para se desenvolver vacinas contra o DENV, atualmente há apenas uma vacina comercialmente disponível que apresenta limitações. Já a produção antígenos virais recombinantes que pode beneficiar tanto o diagnóstico quanto a produção de vacinas apresenta dificuldades que acabam por elevar custos. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar quimeras do vírus da dengue produzidas por métodos computacionais, *de novo design* e dinâmica molecular, como novas alternativas para se produzir moléculas de diagnóstico e ou de vacinais para esse vírus.

A construção de uma vacina seria a melhor forma de prevenção para a dengue, no entanto as vacinas atenuadas e inativadas, formas clássicas, apresentam limitações (WONG *et al.*, 2013). Uma abordagem racional pode contornar essas limitações, a construção de vacinas peptídicas, envolvendo a identificação das proteínas virais adequadas, assim como os possíveis epítomos capazes de estimular resposta humoral e celular, que sejam expostos e que não possuam atividade autoimune (DOYTCHINOVA *et al.*, 2007).

Diversos casos de vacinas peptídicas têm sido geradas com auxílio da bioinformática e algumas validadas em estudo *in vivo*. Alguns exemplos são: epítomos da proteína E5 de papilomavírus humano que se apresentaram com atividade protetiva em animais (LIAO *et al.*, 2013), peptídeos sintéticos que apresentaram elevado nível de proteção contra a *Fasciola hepatica* em camundongos (ROJAS-CARABALLO *et al.*, 2014) e uma vacina de peptídeo contra um tipo de câncer de pulmão tem se mostrado capaz de gerar resposta imune forte mediada por células T, se encontra em ensaio clínico de fase I (SUZUKI *et al.*, 2013).

Entretanto a produção de proteínas recombinantes pode ter alto tempo de processamento e custos elevado, além de reações adversas para os pacientes. Com o aparecimento da tecnologia recombinante de DNA e engenharia de proteínas, as proteínas podem ser obtidas com mais facilidade e superior qualidade (MARTÍNEZ-ALONSO *et al.*, 2009).

Uma forma alternativa de se produzir antígenos recombinantes é através do uso de proteínas carreadoras. Nesse tipo de metodologia um elemento estrutural de um antígeno (epítipo) de uma proteína é transplantado para uma região de uma proteína, nesse caso o carreador. Contudo muitas abordagens têm visado preservar a estrutura do epítipo que acaba por resultar em carreadores quiméricos instáveis. Para superar esta questão, nosso grupo vem empregando com sucesso uma nova abordagem computacional, a engenharia conformacional de antígenos em uma proteína carreadora altamente estável, a TOP7.

A estratégia de “*epitope-scaffolding*”, utilizada neste trabalho, onde foram transplantadas estruturas da proteína DENV-NS1 para TOP7 (*scaffolds*), teve como finalidade principal aumentar a chances de reconhecimentos dos antígenos por partes dos anticorpos, revelando regiões imunogênicas, contribuindo assim de forma bastante positiva para a produção de novas moléculas de diagnóstico e vacinal. Além da questão de estabilizar esses antígenos, esse transplante teve como finalidade aproveitar as características positivas dessa proteína carreadora.

As proteínas nativas em geral são apenas de 5 a 10 kcal·mol⁻¹ mais estáveis do que seus estados desnaturados (CREIGHTON, 1990; Dill *et al.*, 2008). Como essa barreira energética de desnaturação é baixa, pequenas mutações nas proteínas nativas podem desestabilizá-las por completo. Desta maneira as estratégias de exposição epitopos fracassam frequentemente devido à elevada instabilidade conformacional, resultando na perda de conformação nativa e rápida degradação. Uma forma de contorna essa situação é fazendo uso de proteínas carreadoras estáveis como é caso da TOP7.

A TOP7 já foi utilizada para essa finalidade em 2009 por BOSCHEK e colaboradores que projetaram computacionalmente uma TOP7 quimérica (TOP7

CB1) para ligar especificamente a proteína CD4 humana, inserindo uma sequência peptídica derivada de um anticorpo específico de CD4 na TOP7. Os resultados mostram que esta proteína modificada era capaz de se ligar especificamente CD4 e de acordo com simulações de dinâmica molecular, era extremamente resistente à desnaturação térmica e química, além de ser produzida em bactérias (BOSCHEK *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2010).

Esse estratégia também já foi implementada em outros trabalhos do grupo utilizando como referência o epítipo 2F5 de HIV-1, carregado por uma proteína sintética solúvel, que foi avaliado quanto a sua capacidade de ser reconhecido pelo respectivo anticorpo neutralizante monoclonal. A proteína carreadora foi capaz de apresentar o epítipo 2F5, em um contexto similar a proteína nativa, sendo capaz de se ligar com altíssima afinidade ao respectivo anticorpo monoclonal, validando todos os ensaios/padrões de simulação molecular (VIANA *et al.*, 2013).

A escolha da TOP7 como carreadora aconteceu por dois motivos, o primeiro por se trata de uma proteína robusta, portanto boa carreadora de epítopos, que suporta grandes mutações sem um ganho energético muito alto. A robustez da TOP7 como carreador sob condições extremas de pH e temperatura e a sua receptividade para a produção em sistema de expressão bacteriano de custo reduzido, revela o potencial dessa proteína em aplicações biotecnológicas (SOARES *et al.*, 2010). Além disso, é sintética e desenhada computacionalmente pelos desenvolvedores do programa Rosetta (KUHLMAN *et al.*, 2003) e por isso não possui atividade imunogênica, apesar de pequena reação acontecer de forma inespecífica (BOSCHEK *et al.*, 2009; VIANA *et al.*, 2013). Essa característica é importante tendo em vista preservar a especificidade dos antígenos quiméricos que foram produzidos.

A escolha da NS1 para seleção dos epítopos aconteceu, pois já tem sido relatado que as proteínas não estruturais do DENV são promissoras candidatas a antígenos vacinais em formulações monovalentes, através da indução de respostas de células T (AMORIM *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2006, 2007; HENRIQUES *et al.*, 2013; MLADINICH *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 1988). Além disso, essas proteínas são bastante conservadas entre os sorotipos

e não são conhecidos por estarem envolvidos no fenômeno ADE (KHAN *et al.*, 2008). As proteínas não estruturais são alvos relevantes para as respostas T, capazes de controlar a infecção causada por DENV em seres humanos (RIVINO *et al.*, 2013, 2015; WEISKOPF *et al.*, 2015). Estas evidências indicam que essas proteínas são uma alternativa ao desenvolvimento de vacinas anti-DENV.

A NS1 induz a produção de anticorpos neutralizantes, trata-se de uma glicoproteína altamente conservada, expressa como formas associadas à membrana e secretadas logo no início da infecção em nível elevado (DIAS *et al.*, 2013; KASSIM *et al.*, 2011; LIBRATY *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2010). Os anticorpos contra esta proteína pode ser detectada no soro de pacientes antes mesmo do RNA viral ser detectado por RT-PCR (ALCON *et al.*, 2002), tornando-a um importante marcador da fase aguda da infecção, característica interessante para um antígeno diagnóstico.

As sequências codificantes das regiões da proteína NS1 foram selecionadas a partir de isolados do Brasil e da América do Sul. Tendo em vista que os kits de diagnóstico comercialmente disponíveis são geralmente baseados em cepas virais isoladas a partir de infecções em outras regiões do globo, a seleção de sequências antigênicas de isolados locais visou aumentar a sensibilidade dos ensaios imunológicos no reconhecimento do repertório de anticorpos da nossa população. Estudos evolutivos de DENV têm revelado que a sua diversidade genética está aumentando cada vez mais com o passar dos anos (HOLMES; BURCH, 2000), um fator que é fortemente influenciado pela alta variabilidade genética a que estão sujeitos os vírus de RNA. Isso tem implicação direta no entendimento da resposta imunológica do hospedeiro ao vírus, no desenvolvimento de vacinas e no campo de diagnóstico (HOLMES, 2006).

Com a finalidade de obter alto rendimento, as sequências foram otimizadas quanto à presença de sítios internos de restrição, sequências repetitivas longas de DNA, presença de ORFs secundárias, entre outros parâmetros já relatados na literatura como determinantes, em maior ou menor grau, para a expressão protéica em sistemas heterólogos.

A opção de utilizar um sistema de expressão depende de vários fatores, incluindo a utilização pretendida da proteína a ser produzida, a natureza biológica da proteína, a quantidade de proteína necessária, além de custo e tempo envolvidos na produção e purificação. Pesando todas essas variáveis foi escolhido no presente estudo o sistema procarioto utilizando *E. coli*.

Todavia, a maioria das proteínas recombinantes não são eficientemente produzida em *E. coli* devido às diferenças na utilização de códon, toxicidade, instabilidade do RNAm e falta de modificação pós-tradução (GOEDDEL, 1990; MAKRIDES, 1996). A formação de corpúsculos de inclusão, que são acumulação da proteína recombinante como agregados insolúveis é o problema mais comum associado com a produção de proteínas heterólogas em *E. coli*. Estas proteínas agregadas são mal dobradas e biologicamente inativas (BANEYX *et al.*, 2004; VILLAVERDE; CARRIÓ, 2003).

No presente estudo houve uma grande quantidade dos antígenos quiméricos na fração solúvel, superando esse principal problema de expressão apresentado em trabalhos anteriores (ALLONSO *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2001). As quimeras contendo TOP7 apresentaram os valores de rendimentos e solubilidade relativamente maiores (~200 mg/l), quando comparados aos achados na literatura. BATRA *et al.* (2010) expressaram o domínio III da proteína ENV de DENV2 com um rendimento final maior que 50 mg/l, mesmo valor recuperado por Tripathi *et al.* (2011) com a expressão do domínio III da proteína ENV de DENV3, ambos trabalhando com sistema procarioto. Wei *et al.* (2002) obtiveram 100 mg/l da proteína completa ENV sorotipo 2 em sistema eucarioto usando *P. pastoris* como hospedeiro.

Os ELISA realizados neste trabalho apontam para um possível reconhecimento das quimeras proteicas pelos anticorpos anti-NS1 de soros de pacientes positivos para dengue. O nível de detecção obtido em nossos ensaios (2µg/poço e 1µg/ml) é um ótimo resultado se levarmos em consideração o nível de NS1 em soro de pacientes infectados na fase aguda da doença. Segundo a literatura, os níveis NS1 circulantes variam entre os indivíduos durante o curso da doença, e vão desde nanogramas por mililitro a vários microgramas

por mililitro, com um caso documentado de valores de até 50 µg/ml de proteína NS1 no soro (ALCON *et al.*, 2001).

Os resultados também apontam para a eficácia da metodologia abordada para a geração de proteínas, conformacionalmente adequadas, para a utilização em ensaios sorológicos. Desta forma indicando que o desenho racional de peptídeos pode otimizar o trabalho de bancada em laboratório e faz dessa uma importante alternativa para desenvolver antígenos com fins diagnóstico e vacinais.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

a) Através das técnicas computacionais foi desenvolvida uma quimera energeticamente e estruturalmente estável e selecionada para expressão em sistema procaríoto, juntamente com as suas variantes para os diferentes sorotipos de dengue.

b) A otimização das sequências gênicas das proteínas quiméricas virais desenvolvidas computacionalmente resultou em níveis elevados de expressão de proteína sem corpos de inclusão, apresentando alta solubilidade e rendimento em sistema de expressão procariótico.

c) A sensibilidade e a especificidade dos antígenos produzidos podem ser consideravelmente melhoradas, com técnicas mais precisas de purificação de proteínas forem aplicadas, tais como HPLC.

d) Os sinais detectados nos ELISA sugerem um possível reconhecimento das proteínas quiméricas contendo os epítomos de NS1.

e) Nossos resultados corroboram com outros resultados encontrados em trabalhos do grupo que mostram que a TOP7 é uma proteína carreadora adequada para proporcionar a estabilidade estrutural necessária a epítomos alvos predeterminados, permitindo a utilização dessas moléculas quiméricas como possíveis antígenos para reconhecimento específico de anticorpos e/ou estimulação da resposta imune.

REFERÊNCIAS

ALCON, S., *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 376–381, 2002.

ALLONSO, D., *et al.* Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. **Journal of Virological Methods**, v. 175, p. 109–116, 2011.

AMORIM, J.H., *et al.* Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal of Virological Methods**, v. 167, p. 186-192, 2010.

AMORIM, J.H.; DINIZ, M.O.; CARIRI, F.A., *et al.* Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. **Vaccine**, v. 30, p. 837–845, 2011.

ANDERSON, R., *et al.* Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. In: CHAMBERS, T. J; MONATH, T. P. (Ed.). **The Flavivirus: structure, replication and evolution**. 1 ed. Academic Press, p. 229-274, 2003.

ARAÚJO, F.M.C., *et al.* Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Virological Methods**, v. 177, p. 128–131, 2011.

ASSENBERG, R., *et al.* Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. **J Virol**, v. 83, p. 895-906, 2009.

ATIAS, D., *et al.* Chemiluminescent optical fiber immunosensor for the detection of IgM antibody to dengue virus in humans. **Sens Actuators B Chem**, v. 140, p. 206–215, 2009.

BANEYX, F.; Mujacic, M. Recombinante proteína dobramento e misfolding em *Escherichia coli*. **Nat Biotechnol**. v. 22, p. 1399-1408, 2004.

BARRETO, M.L.; Teixeira, M.G. Dengue no Brasil: Situação epidemiológica e contribuições. Agenda Uma Pará de Pesquisa. **Estudos Avançados**. v. 22, p. 53-72, 2008.

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

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

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

BHATT, S., *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504-507, 2013.

BISSET, J.A., *et al.* Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 25. p. 233–239, 2011.

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

BLACKSELL, S.D. Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: recent evaluations and future needs? **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 151967, 2012.

BLAIR, P.J., *et al.* Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. **Vaccine**, v. 24, p. 1427–1432, 2006.

BLOCK, O.K., *et al.* A tetravalent recombinant dengue domain III protein vaccine stimulates neutralizing and enhancing antibodies in mice. **Vaccine**, v. 28, p.8085–8094, 2010.

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

BOSCHEK, C.B., *et al.* Engineering an ultra-stable affinity reagent based on Top7. **Prot Eng Des Sel**, v. 22, p. 325–332, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue - Informações Técnicas**. Brasília, 2014, disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>>. Acesso em: 01 de outubro, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue - Informações Técnicas**. Brasília, 2015, disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>>. Acesso em: 11 de fevereiro, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue - Informações Técnicas**. Brasília, 2016, disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>>. Acesso em: 09 de fevereiro, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue - Informações Técnicas- Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2016**. Brasília, 2017, disponível em: <<http://portalquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/Dengue-classica-ate-2016.pdf>>. Acesso em: 09 de fevereiro, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue - Informações Técnicas- Óbitos por Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2016**. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://portalquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/obitos-ate-2016.pdf>>. Acesso em: 09 de fevereiro, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. 4. ed. Brasília, Ministério da Saúde, 2013. 80 p

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde: SES / SINAN**. 2015, disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/>>. Acesso em: 24 de janeiro, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tópicos de Saúde – D. Dengue**. Brasília, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22207>. Acesso em: 24 de janeiro, 2017.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Balanço Dengue: Semana Epidemiológica 1 a 53 de 2015**. Brasília, 2016. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivo/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf>. Acesso em 15 de janeiro, 2017.

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

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

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

BRUM, M.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E. (ed) **Virologia Veterinária**, editora UFSM, Santa Maria, p. 61-75, 2007.

CAPEDING, M.R. *et al.* Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 384, p. 1358-1365, 2014.

CARMO, A.C.V. *et al.* Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. **Antiviral Research Antiviral Res**, v. 94, p. 126-30, 2012.

CARVALHO, D.O., *et al.* Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, p. e0003864, 2015.

CAVALCANTI, I.T., *et al.* A disposable chitosan-modified carbon fiber electrode for dengue virus envelope protein detection. **Talanta**, v. 91, p. 41–46, 2012.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL- CDC (Estados Unidos). **Division of vector-borne infectious diseases**. Atlanta, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm>>. Acesso em: 01 de novembro, 2015.

CERVANTES, S.M., *et al.* Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: this interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. **Virology**. v. 484, p. 113–126, 2015.

CHADWICK, D., *et al.* Distinguishing dengue fever from other infections on the basis of simple clinical and laboratory features: Application of logistic regression analysis. **J Clin Virol**. v. 35, p. 147–153, 2006.

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

CHAMBERS, T.J., *et al.* Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. **Proc. Natl Acad**. v. 87, p. 8898–8902, 1990.

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

CHEN, H.; COOTE, B.; HISCOX, J.A. Evaluation of a nucleoprotein-based enzymelinked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. **Avian Pathol**, Huntingdon, v.32, n.5, p. 519-526, 2003.

CHEN, H.W., *et al.* A novel technology for the production of a heterologous lipoprotein immunogen in high yield has implications for the field of vaccine design. **Vaccine**, v. 27, p. 1400–1409, 2009.

CHEN, L.H.; WILSON, M.E. Dengue and chikungunya infections in travelers. **Curr Opin Infect Dis**, v. 23, p. 438–44, 2010.

CHENG, G., *et al.* Mosquito defense strategies against viral infection. **Trends Parasitol**, v.32, p. 177–186, 2016.

CHUANSUMRIT, A., *et al.* Dengue nonstructural protein 1 antigen in the urine as a rapid and convenient diagnostic test during the febrile stage in patients with dengue infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 467–469, 2011.

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

CLINICALTRIALS.gov TDENV PIV and LAV Dengue Prime-boost Strategy. Maryland: WRAIR, 2014. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02239614?term=TDENV+PIV+and+LAV+dengue+prime-boost+strategy&rank=1>>. Acesso em: 30 December, 2015.

CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 80, p. 11418-11431, 2006.

COHEN, S.N.; Boyer, H.W. Process for Producing Biologically Functional Molecular Chimeras. **US Patent**, v. 4, p. 224-237, 1980.

COLLER, B.A., *et al.* The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. **Vaccine**, v. 29, p. 7267–7275, 2011.

CONSTENLA, D.; CLARK, S. Financing dengue vaccine introduction in the Americas: challenges and opportunities. **Expert Rev Vaccines**, v. 15, p. 547–559, 2016.

CORDEIRO, M.T., *et al.* Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute dengue infection based on IgG ELISA. **PLoS ONE**, v. 4, p. e4945, 2009.

CORREIA, B.E. *et al.* Proof of principle for epitope-focused vaccine design. **Nature**, v. 507, p. 201-206, 2014.

COSTA, S.M., *et al.* DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. **Virology**, v. 358, p. 413–423, 2007.

COSTA, S.M.; Freire, M.S.; Alves, A.M.B. DNA vaccine against the nonstructural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. **Vaccine**, v. 24, p. 4562–4564, 2006.

COSTA, M.A.R. **A Ocorrência do Aedes aegyptina Região Noroeste do Paraná: um estudo sobre a epidemia da dengue em Paranavaí –1999, na perspectiva da Geografia Médica.** 214p. Dissertação (Mestrado em Institucional em Geografia). Universidade Estadual Paulista-Faculdade Estadual de Educação Ciências e Letras de Paranavaí, Presidente Prudente, 2001.

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

CREIGHTON, T.E. Protein folding. **Biochemical Journal**, v. 270, p. 1-16, 1990.

CRUZ, O.C., *et al.* Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiol**, v. 39, p. 155–170, 2015.

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

DE ALWIS, R., *et al.* Dengue viruses are enhanced by distinct populations of serotype cross-reactive antibodies in human immune sera. **PLoS Pathog**, v. 10, p. e1004386, 2014.

DE SOUZA, V.A.U.F, *et al.* Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections. **J. Clin. Microbiol**, v. 42, p. 1782–1784, 2004.

WHO. **Dengue, countries or areas at risk, 2013**. Geneva, 2014. Disponível em: <http://gamapservet.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_IHTRiskMap.png>. Acesso em: 30 dez, 2016.

DIAS, A.C., *et al.* A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosens. Bioelectron**, v. 44, p. 216–221, 2013.

DICK, O.B, *et al.* The history of dengue outbreaks in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 584–593, 2012.

DILL, K.A, *et al.* The Protein Folding Problem. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, p. 289-316, 2008.

DOUGLAS, D.; WICHMANN, O.; DEROECK, D. **The perceived need for dengue vaccine in dengue endemic countries**. 3rd edition. Vaccine Global Congress, Singapore, p. 4-6, 2009.

DOYTCHINOVA, I.A.; FLOWER, D.R.; VAXI, J. A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinform**, v. 8, n. 1, p. 4, 2007.

DURAND, M.A., *et al.* An outbreak of dengue fever in Yap State. **Pac Health Dialog**, v. 12, p. 99-102, 2005.

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

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

FERES, V. *et al.* Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. **J Clin Virol**, v.37, p. 179-183, 2006.

FREIRE, T.V.I., *et al.* De Novo Design and Biophysical Characterization of an Affinity-Enhanced Protein Displaying the Structure of the Broadly Neutralizing HIV-1 2F5 Antibody Epitope. **Biophysical Journal (Print)**, v. 110, p. 346, 2016.

FRY, S.R., *et al.* The Diagnostic Sensitivity of Dengue Rapid Test Assays is Significantly Enhanced by Using a Combined Antigen and Antibody Testing Approach. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e1199, 2011.

FU, G., *et al.* Female-specific flightless phenotype for mosquito control. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, p. 4550–4554, 2010.

REZZA, G. *Aedes albopictus* and the reemergence of dengue. **BMC Public Health**, v. 12, article 72, 2012.

GOEDDEL, D.V. Systems for heterologous gene expression. **Methods in Enzymology**, v. 185, p. 3–7, 1990.

GOULD, E.A.; SOLOMON, T.; MACKENZIE, J.S. Does antiviral therapy have a role in the control of Japanese encephalitis? **Antiviral Research**, v. 78, p. 140–149, 2008.

GUBLER, D.J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. Charles Franklin Craig Lecture. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 571–578, 1989.

GUBLER, D.J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status, **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, p. 3–16, 2006.

GUBLER, D.J. Dengue viruses. In: Mahy BW (ed.). **Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology**. Boston: Academic Press, p. 372–382, 2010.

GUBLER, D.J.; Clark, G.G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, 1995. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/1/2/95-0204_article?commit=GO>. Acesso em: 12 Dez, 2016.

GUIRAKHOO, F., *et al.* Safety and efficacy of chimeric yellow Fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. **J Virol**, v. 78, p. 4761–4775, 2004.

GUPTA, E.; BALLANI, N. Current perspectives on the spread of dengue in India. **infect Drug Resist**, v. 7, p. 337-342, 2014.

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

GURUGAMA, P., *et al.* Dengue viral infections. **Indian J Dermatol**, v. 55, p. 68–78, 2010.

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

GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Lessons and challenges. **J Clin Virol**, v. 27, p. 1–13, 2003.

GUZMAN, M.G., *et al.* Dengue: A continuing global threat. **Nat. Rev. Microbiol.**, 8, S7-16, 2010.

GUZMAN, M.G. Domain III of the envelope protein as a dengue vaccine target. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 2, p.137–147, 2010.

GUZMAN, M.G., *et al.* Final characterization of and lessons learned from the dengue 3 epidemic in Cuba, 2001-2002. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 19, p. 282–289, 2006.

HADINEGORO, S.R., et al. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. **N Engl J Med**, v. 373, p. 1195–1206, 2015.

HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, p. 476–481, 1988.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, v. 10, p.370, n. 9599, p. 1644–1652, 2007.

HALSTEAD, S.B.; COHEN, S.N. Dengue hemorrágica aos 60 anos: evolução precoce dos conceitos de causalidade e tratamento. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 79, p. 281-291, 2015.

HAMMON, W.M.C.D. *et al.* New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. **Transactions of the Association of American Physicians**, Philadelphia, v. 73, p. 140-155, 1960.

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

HANS, F.; Peter, G.W. Biomolecules: Where the physics of simplicity and complexity meet. **Physics Today**, v. 47, p. 58-64, 1994.

HAO, J., *et al.* Identification and Rational Redesign of Peptide Ligands to CRIP1, A Novel Biomarker for Cancers. **PLoS Comput Biol**, v. 4, p. e1000138, 2008.

HARRIS, A.F., *et al.* Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. **Nat Biotechnol**, v. 30, p. 828–30, 2012.

HARRIS, A.F., *et al.* 2011. Field performance of engineered male mosquitoes. **Nat Biotechnol**, v. 29, p. 1034–1037.

HASAN, S., *et al.* Dengue virus: A global human threat: Review of literature. **J Int Soc Prev Community Dent**, v. 6, p. 1-6, 2016.

HASSAN, M.I., *et al.* Structural model of human PSA: a target for prostate cancer therapy. **Chem. Biol. Drug Des**, v. 70, p. 261–267, 2007.

HAYES, E.B.; GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Pediatr Infect Dis J**, v. 11, p. 311-317, 1992.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HENRIQUES, H.R., *et al.* Targeting the nonstructural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7:e2330, 2013.

HOCHULI, E.; Piesecki, S. Interaction of hexahistidine fusion proteins with nitrilotriacetic acid-chelated Ni²⁺ ions. **Methods**, v. 4, p. 68-72, 1992.

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

HOLMES, E.C.; BURCH, S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 74-77, 2000.

HUANG, C.J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 383-399, 2012.

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

HUNSPERGER, E. A., *et al.* Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e3171, 2014.

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

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

JOHNSON, S.; *et al.* Disponível em: <<http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm>>. Acesso em: 6 de maio, 2016.

KAO, C.L., *et al.* Laboratory diagnosis of dengue virus infection: Current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **J. Microbiol. Immunol. Infect**, v. 38, p. 5–16, 2005.

KASSIM, F.M., *et al.* Use of dengue NS1 antigen for early diagnosis of dengue virus infection. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 42, p. 562–569, 2011.

KATO, F.; HISHIKI, T. Dengue Virus Reporter Replicon is a Valuable Tool for Antiviral Drug Discovery and Analysis of Virus Replication Mechanisms. **Viruses**, v. 8, n. 5, pii: E122, 2016.

KHAN, A.M., *et al.* Conservation and variability of dengue virus proteins: implications for vaccine design. **PLoS Negl Trop Dis**, 2:e272, 2008.

KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pac. J. Trop. Biomed**, v. 2, p. 159–162, 2012.

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

KILPATRICK, A.M.; Randolph, S.E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. **Lancet**, v. 380, p. 1946–1955, 2012.

KIMURA, R.; Hotta, S. Studies on dengue virus (VI). On the inoculation of dengue virus into mice. **Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi**, Tokyo, v. 3379, p. 629-633, 1944.

KING, C.A., *et al.* Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. **J Virol**, v. 74, p. 7146-7150, 2000.

KINNEY, R.M., *et al.* Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in vero cell cultures with morpholino oligomers. **Journal of Virology**, v. 79, p. 5116–5128, 2005.

KONG, Y.Y., *et al.* Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. **J. Virol. Methods**, v. 138, p. 123–130, 2006.

KOST, T.A. Expression vectors and delivery systems tools for determining gene function and gene therapy. **Curr Opin Biotechnol**, v. 10, p. 409-410, 1999.

KOURÍ, G., *et al.* Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 89–92, 1998.

KRAEMER, M.U., *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, v. 4, p. 08347, 2015.

KUHLMAN, B., *et al.* Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. **Science**, v. 302, p. 1364–1368, 2003.

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

KURANE, I., *et al.* T-cell responses to dengue virus in humans. **Trop Med Health**, v. 39(4 Suppl), p. 45–51, 2011.

KYTE, J; DOOLITTLE, R.A. Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, p. 105-132, 1982.

LACROIX, R., *et al.* Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. **PLoS One**, v. 7, p. e42771, 2012.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T.W.; GUBLER, D.J. Consequências da distribuição global em expansão de *Aedes albopictus* para transmissão do vírus da dengue. **PLoS negl Trop Dis**, v. 4, p. e646, 2010.

LANCIOTTI, R.S. *et al.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, p. 545-551, 1992.

LEE, K.S.; LO, S.; TAN, S.S. Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and in situ evolution. **Infect Genet Evol**, v. 12, p. 77–85, 2012.

LENG, C.H., *et al.* A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. **Microbes Infect**, v. 11, p. 288–295, 2009.

LIAO, S.J., *et al.* HPV16 E5 peptide vaccine in treatment of cervical cancer in vitro and in vivo. **J. Huazhong Univ. Sci. Technol**, v. 33, p. 735–742, 2013.

LIBRATY, D.H., *et al.* High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J. Infect. Dis**, v. 186, p. 1165–1168, 2002.

LIMA, M.D.R.Q., *et al.* Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 4:e738, 2010.

LIN, C.C.; CHEN, W.C. Treatment Effectiveness of Amantadine Against Dengue Virus Infection. **Am J Case Rep**, v. 17, p. 921-924, 2016.

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

LINDENBACH, B.D., *et al.* Advances in Virus Research, The Flaviviruses: Detection. **Diagnosis and Vaccine Development**, California, v. 59, p.235-289, 2003.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.J.; RICE, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, DM, Howley, PM. **Fields Virology**, 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v. 1, p. 1102-1148, 2007.

LU, P., *et al.* Wolbachia induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, p. e1754, 2012.

LU, Y., *et al.* Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 21, p. 2178–2189, 2003.

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

MACAULEY, P.S. *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, Chichester, v. 22, p. 249-270, 2005.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 512–538, 1996.

MALAVIGE, G.N., *et al.* Dengue viral infections. **Postgrad Med J**, v. 80, n. 948, p. 588-601, 2004.

MARTÍNEZ-ALONSO M, *et al.* Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies. **Microb Cell Fact**, v. 8, p. 4, 2009.

MATHEW, A. Impaired T cell proliferation in acute dengue infection. **J Immunol**, 162:5609–5615, 1999.

MELINO, S.; PACI, M. Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3 pro inhibition for a therapeutic-based approach. **FEBS J**, v. 274, p. 2986-3002.

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

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

MIDGLEY, C.M., *et al.* An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. **J Virol**, v. 85, p. 410–421, 2011.

MLADINICH, K.M., *et al.* Dengue virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes target NS1, NS3, and NS5 in infected Indian rhesus macaques. **Immunogenetics**, v. 64, n. 2, p. 111-21, 2012.

MOI, M.L.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Human antibody response to dengue virus: implications for dengue vaccine design. **Trop Med Health**, v. 14, p. 44-51, 2016.

MONATH, T.P. Treatment of yellow fever. **Antiviral Res**, v. 78, p. 116–124, 2008.

MORRA, G.; COLOMBO, G. Relationship between energy distribution and fold stability: insights from molecular dynamics simulations of native and mutant proteins. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 72, p. 660–672, 2008.

MORRISON, D., *et al.* A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naive adults. **J Infect Dis**, v. 201, p. 370–377, 2010.

MORROW, J.F., *et al.* Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 71, p. 1743–1747, 1974.

MUHAMMAD, S. *et al.* NS1 antigen: A new beam of light in the early diagnosis of dengue infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, p. 1212-1214, 2016.

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

MUÑOZ, B.J.A. Report on the epidemic that has suffered this city, commonly named dengue. **Oficina del Gobierno y Capitanía General**, Spanish, v. 1, p. 26, 1828.

MURPHY, B.R.; Whitehead, S.S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 587–619, 2011.

MURPHY, F.A. Togavirus morphology and morphogenesis. In: Schlesinger, RW (ed.) **The Togaviruses**. Biology, Structure, Replication. New York: Academic Press, 1980.

NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; JUNIOR, S.K. A comparative study of available software for high accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. **Protein Science**, v. 15, p. 808-824, 2006.

NISHIURA, H.; HALSTEAD, S.B. Natural history of dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 infections: reanalysis of classic studies. **J Infect Dis**, v. 195, p. 1007-13, 2007.

KHETARPAL, N.; KHANNA, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. **J Immunol Res**, v. 2016, 6803098, 2016.

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

NUNES, M.R., *et al.* Evaluation of an immunoglobulin M-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for rapid diagnosis of dengue infection. **J. Virol. Methods**, v. 171, p. 13–20, 2011.

OMOKOKO, M.D. *et al.* A highly conserved region between amino acids 221 and 266 of dengue virus non-structural protein 1 is a major epitope region in infected patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 91, n. 1, p. 146-155, 2014.

OSORIO, J.E., *et al.* Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. **Vaccine**, v. 29, p. 7251–7260, 2011.

OSORIO JE, *et al.* Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus -naïve healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study. **Lancet Infect Dis**, v. 14, p. 830–838, 2014.

PALOMARES, L.A.; MENA, J.A.; RAMÍREZ, O.T. Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: Production of virus-like particles, **Methods**, v. 56, p. 389-95, 2012.

PANG, E.L.; LOH, H.S. Current perspectives on dengue episode in Malaysia, **Asian Pac J Trop Med**, v. 9, p. 395-401, 2016.

PARKASH, O.; SHUEB, R.H. Diagnosis of Dengue Infection Using Conventional and Biosensor Based Techniques, **Viruses**, v. 7, p. 5410-5427, 2015.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, v.17, p. 671-679, 2016.

PEELING, R.W., *et al.* Evaluation of diagnostic tests: Dengue. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 8, p. S30–S38, 2010.

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

PERRET, B.G., *et al.* Expression of EGFP-amino-tagged human mu opioid receptor in Drosophila Schneider 2 cells: a potential expression system for largescale production of G-protein coupled receptors. **Protein Expression and Purification**, v. 31, p. 123-132, 2003.

PHUC, H.K., *et al.* Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC Biol.**, v. 5, p. 11, 2007.

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

PRINCE, H.E.; YEH, C.; LAPÉ-NIXON, M. Utility of IgM/IgG ratio and IgG avidity for distinguishing primary and secondary dengue virus infections using sera collected more than 30 days after disease onset. **Clin. Vaccine Immunol**, v. 18, p. 1951–1956, 2011.

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

PUCCIONI-SOHLER, M.; ROSADAS, C. Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 73, p. 698-703, 2015.

QI, R.F.; ZHANG, L.; CHI, C.W. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. **Acta Biochim Biophys Sin Shanghai**, 40:91-101, 2008.

QUEIROZ-LIMA, M.R. *et al.* A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1147, 2011.

DE ALWIS, R., *et al.* In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, Article ID e1188, 2011.

LACROIX, R., *et al.* Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42771, 2012.

RATHAKRISHNAN, A.; SEKARAN, S.D. New development in the diagnosis of dengue infections. **Expert Opin. Med. Diagn**, v. 7, p. 99–112, 2013.

RATZKIN, B.; CARBON, J. Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.74, p. 487–491, 1977.

RAVIPRAKASH, K., *et al.* Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. **Virology**, v. 290, p. 74–82, 2001.

RAVIPRAKASH, K., *et al.* Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques. **J Gen Virol**, v. 81, p. 1659–1667, 2000.

RAY, D.; SHI, P.Y. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, p. 45–55, 2006.

RICE, C.M., *et al.*, Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, v. 229, p. 726–733.

RIGAU-PÉREZ, J.G., *et al.* Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v.352, p. 971–977, 1998.

RIVINO, L., *et al.* Virus-specific T lymphocytes home to the skin during natural dengue infection. **Sci Transl Med**, v. 7, 278ra35, 2015.

RIVINO, L., *et al.* Differential targeting of viral components by CD4⁺ versus CD8⁺ T lymphocytes in dengue virus infection. **J Virol**, v. 87, p. 2693–2706, 2013.

ROJAS-CARABALLO, J., *et al.* In vitro and in vivo studies for assessing the immune response and protection-inducing ability conferred by fasciola hepatica-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes. **PLoS ONE**, v. 9, p. e105323, 2014.

ROOPASHRI, G., *et al.* Clinical and oral implications of dengue Fever: a review. **J Int Oral Health**, v. 7, p. 69-73, 2015.

ROSANO, G.L.; Ceccarelli, E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Front. Microbiol**, v. 5, p. 172, 2014.

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

ROSE, N., *et al.* Generation of monoclonal antibodies against native viral proteins using antigen-expressing mammalian cells for mouse immunization. **BMC Biotechnol**, v. 16, p. 83, 2016.

RUSH, A.B. An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. In: Rush AB (ed.). **Medical Enquiries and Observations**. Philadelphia: Prichard and Hall, p. 104–117, 1789.

APTE-SENGUPTA, S.; SIROHI, D.; KUHN, R.J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 9, p. 134–142, 2014.

HALES, S., *et al.* Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model. **Lancet**, v. 360, n. 9336, p. 830–834, 2002.

SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Experimental dengue vaccines, **Molecular Vaccines: From Prophylaxis to Therapy**, v. 1, p. 135–151, 2013.

SABCHAREON, A., *et al.* Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **Lancet**, v. 380, p. 1559–1567, 2012.

SABIN, A.B.; SCHLESINGER, R.W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, v. 101, p. 640–642, 1945.

SAM, J.E.; GEE, T.S.; Nasser, A.W. Deadly intracranial bleed in patients with dengue fever: A series of nine patients and review of literature. **J Neurosci Rural Pract**, v. 7, p. 423-34, 2016.

SAMISH I, *et al.* Theoretical and computational protein design. **Rev. Phys. Chem**, v. 62, p. 129-149, 2011.

SANGKAWIBHA, N., *et al.* Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. **Am J Epidemiol**, v. 120, p. 653-669, 1984.

Sanofi Pasteur Media Release. Disponível em:
<<http://www.sanofipasteur.com/en/articles/First-Vaccinations-against-Dengue-Mark-Historic-Moment-in-Prevention-of-Infectious-Diseases.aspx>>. Acesso em: 8 dezembro, 2016

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

SCHNEIDER, J.; DROLL, D.A. Timeline for Dengue in the Americas to December 31, 2000 and Noted First Occurrences. Pan American Health Organization (PAHO). **Division of Disease Prevention and Control**. Washington DC, 2001.

SELCK, F.W.; ADALJA, A.A.; BODDIE, C.R. An estimate of the global health care and lost productivity costs of dengue. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 14, p. 824–826, 2014.

SHIVPURI, A. Dengue-An overview. **Dent Med Probl**, v. 48, p. 153–156, 2011.

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

SHU, P.Y.; HUANG, J.H. Current Advances in Dengue Diagnosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**, v. 11, p. 642–650, 2004.

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

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

SIQUEIRA, J.B., *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 48–53, 2005.

SIRIVICHAYAKUL, C., *et al.* Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue vaccine (TDV) in healthy children and adults in endemic regions: a randomized, placebo-controlled Phase 2 study. **J Infect Dis**, v. 213, p. 1562–1572, 2016.

SOARES, T.A., *et al.* Molecular basis of the structural stability of a Top7 based scaffold at extreme pH and temperature conditions. **J Mol Graph Model**, v. 28, p. 755-65, 2010.

SOPER, F.L. *Aedes aegypti* and yellow fever. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 36, p. 521–527, 1967.

STEIN, D.A., *et al.* Treatment of AG129 mice with antisense morpholino oligomers increases survival time following challenge with dengue 2 virus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 555–565, 2008.

SUBEDI D; TAYLOR-ROBINSON, A.W. Laboratory diagnosis of dengue infection: Current techniques and future strategies. **Open J. Clin. Diagn**, v. 4, n. 1, p. 63-70, 2014.

SUZUKI H, *et al.* Multiple therapeutic peptide vaccines consisting of combined novel cancer testis antigens and anti-angiogenic peptides for patients with non-small cell lung cancer. **J. Trans. Med.**, v. 11, p. 97, 2013.

TALARICO, L.B., *et al.* The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, v. 66, p. 103–110, 2005.

TANG, K.F.; OOI, E.E. Diagnosis of dengue: An update. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 10, p. 895–907, 2012.

TEIXEIRA, M.G. *et al.* Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Inf Epidemiol SUS**, n. 8, p. 5-33, 1999.

TEIXEIRA, M.G., *et al.* Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saude Publica**, 25(supplement 1):S7–S18, 2009.

TELES, F.S. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 687, p. 28–42, 2011.

TRAN, T.N., *et al.* Enzyme-linked immunoassay for dengue virus IgM and IgG antibodies in serum and filter paper blood. **BMC Infect Dis**, v. 6, p. 13, 2006.

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

UMAREDDY, I., *et al.* Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **J Gen Virol**, v. 87, p. 2605-2614, 2006.

VAPNEK, D., *et al.* Expression in Escherichia coli K-12 of the structural gene for catabolic dehydroquinase of Neurospora crassa. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 74, p. 3508–3512, 1977.

VASILAKIS, N., *et al.* Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, p. 532-541, 2011.

VIANA, I.F.T. De Novo Design of Immunoreactive Conformation-specific HIV-1 Epitopes based on Top7 Scaffold. **RSC Advances: an international journal to further the chemical science**, v. 3, p. 11790-11800, 2013.

VILLAR L *et al.* Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. **New England Journal of Medicine**, v. 372, p. 113-123, 2015.

VILLAVERDE, A.; CARRIÓ, M.M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1385–1395, 2003.

DEJNIRATTISAI, W. *et al.* Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in HUMANS. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 745–748, 2010.

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

WALSH, G. *Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology*. London: Wiley, p. 94, 1998.

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

WEISKOPF D, *et al.* The human CD8⁺ T cell responses induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine are directed against highly conserved epitopes. **J Virol**, v. 89, p. 120–128, 2015.

WEISKOPF, D., *et al.* Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1⁺ cytotoxic CD4⁺ T cells associated with protective immunity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 112, p. 4256–4263, 2015.

WHITEHEAD, S.S., *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol.**; v. 5, p. 518-28, 2007.

WHO. **Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever**. Geneva, Switzerland, 2011.

WHO. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition**. Geneva, 2009.

WILLIAMS, K.L., *et al.* Antibodies targeting dengue virus envelope domain III are not required for serotype-specific protection or prevention of enhancement in vivo. **Virology**, v. 429, p. 12–20, 2012.

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

WONG, S.S.; WEBBY, R.J. Traditional and new influenza vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 476–492, 2013.

World Health Organization Western Pacific Region (WPRO). **Emerging disease surveillance and response: dengue situation update number 468**. Disponível em: <http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/DengueSituationUpdates/en/>. Acesso em: 6 July, 2015.

WHO. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition**. Geneva, 2009.

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

WU, S.J., *et al.* Human skin langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat Med**, v. 6, p. 816–820, 2000.

YOUNG, P.R., *et al.* An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 1053–1057, 2000.

YU, Y. Phenotypic and genotypic characteristics of Japanese encephalitis attenuated live vaccine virus SA14-14-2 and their stabilities. **Vaccine**, v. 28, p. 3635–3641, 2010.

ZHANG YM, *et al.* Immunization of mice with dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by baculovirus recombinant induces resistance to dengue virus encephalitis. **J Virol**, v. 62, p. 3027–3031, 1988.

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

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

APÊNDICE A- CURRICULUM VITAE (LATTES)

Antonio Fernando da Purificação Júnior

Curriculum Vitae

Fevereiro/2017

Antonio Fernando da Purificação Júnior

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome: Antonio Fernando da Purificação Júnior

Sexo: Masculino

Filiação: Antonio Fernando da Purificação e Maria Lucia da Purificação

Nascimento: 24/10/1990 - Macaparana/PE - Brasil

Carteira de Identidade: 8280800 SDS - PE - 04/04/2007

CPF: 094.105.144-79

Endereço residencial: Rua São Mateus- 255 AP- 106

Iputinga - Recife

50680-000, PE - Brasil

Celular: 81 996867304

Endereço eletrônico: afpjr@outlook.com

TITULAÇÃO

2015 Mestrado em Genética

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil.

Título: EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS
CONTENDO EPÍTOPOS NS1 DO VÍRUS DA DENGUE PARA
FINS DIAGNÓSTICOS

Orientador: Rafael Dhalia

Co-orientador: Roberto Dias Lins Neto

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Áreas do conhecimento: Genética

2011 - 2015 Graduação em Biomedicina

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL DE BACTÉRIAS DO RIACHO CAVOUÇO NO MUNICÍPIO DE RECIFE-PE

Orientador: Maria Betânia de Melo Oliveira

PRODUÇÃO ACADÊMICA E PESQUISA

Trabalhos publicados em anais de eventos

PURIFICAÇÃO JUNIOR, A. F.; COELHO, D. F.; CAIADO, B. V. R.; Lins, R.D; DHALIA, R. CHIMERIC PROTEIN EXPRESSION CONTAINING EPITOPES NS1 OF DENGUE VIRUS FOR DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC KITS AND VACCINES In: XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology, 2015, Florianópolis- SC. Virus Reviews and Research. Novo Hamburgo, RS - Brasil: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2015. v.20.p.1 – 275.

2015 - 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz de Iguaçu/PR, "Phenotypic Characterization Of Gram-Positive Bacteria Isolated Of

Cavouco Creek, Pernambuco-Brazil” – **PURIFICAÇÃO JUNIOR, A. F**; ARAUJO, LCA; SILVA, SM; SILVA, MV; CORREIA, MTS; LOPES, ACS; OLIVA, MLV; OLIVEIRA, MBM, 2015. SBBq & IUBMB 2015. , 2015. v.1. *Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: [http://www.sbbq.org.br/iubmb2015/?page_id=1309].*

Apresentação de Trabalhos/Resumos em Congressos Profissionais (Locais, Regionais, Nacionais, Internacionais)

2015 - V Jornada de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, com o pôster: “Avaliação da Imunogenicidade de antígenos quiméricos de dengue para fins de diagnóstico e vacinais” –

PURIFICAÇÃO JUNIOR, A. F; COÊLHO, DF; CAIADO, BVR;. LINS, RD; DHALIA, R., 2015.

Comissão organizadora, avaliador ou Monitor em eventos científicos e de extensão

2016- Avaliador de pôster do I Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular da Fiocruz Pernambuco no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- FIOCRUZ/PE, Brasil. 18 a 29 de Janeiro de 2016.

2015 – Membro da comissão organizadora do curso de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Vacinas e Novas terapias antivirais, no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE, 10 a 14 de Agosto de 2015.

2016 - Membro da comissão organizadora do I Curso de Verão em Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE, 18 a 29 de Janeiro de 2016.

2015 – Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Vacinas e Novas terapias antivirais, Monitor (Carga horária: 40h). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE, 10 a 14 de Agosto de 2015.

Palestra/Apresentação oral em Congressos e Reuniões Científicas

2015 – Palestrante: “Métodos de caracterização de sementes vacinais e dosagem antigênica” no curso de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Vacinas e Novas terapias antivirais, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ/PE, 10 a 14 de Agosto de 2015.

2016- Apresentou, na forma de Comunicação Oral, o resumo intitulado EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS CONTENDO EPÍTOPOS NS1 DO VÍRUS DA DENGUE PARA FINS DIAGNÓSTICOS E VACINAIS, com autoria de **Purificação Júnior, A.F.**; Coêlho, D. F.; Caiado, B.V.R.; Dhalia, R.; Lins, R.D., durante o XXI Encontro de Genética do Nordeste, realizado em Recife, Pernambuco, no período de 29 de Novembro a 02 de Dezembro de 2016.

Outros projetos desenvolvidos

2015-2016- Atuou no projeto de engenharia de peptídeos do vírus ZIKA, com o propósito de produzir e avaliar antígenos artificiais capazes de serem reconhecidos especificamente por anticorpos e assim serem utilizados como

possíveis antígenos de diagnóstico e vacinais.

Artigos em desenvolvimento:

GUARINES, KLARISSA M., **PURIFICAÇÃO, JUNIOR, A. F et al**, Next-generation sequencing of Chikungunya virus complete genome. **Previsão de submissão para primeiro semestre de 2017.**

APÊNDICE B- ARTIGO PARA SUBMISSÃO

Journal of Viral Hepatitis (JVH)

Production of HAV virus-like particles by baculovirus/insect cells system

Bruna Varginha Ramos Caiado^{1,4*}; Regina C. Bressan Queiroz Figueiredo²;

Renato Sousa; Camila Fernandes³; Antonio Fernando da Purificação

Junior^{1,4}; Rafael Dhalia^{1,4}

¹Department of Virology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz-PE), Recife, PE, Brazil

²Department of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz-PE), Recife, PE, Brazil

³Department of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz-PE), Recife, PE, Brazil

⁴Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

* Corresponding author:

e-mail: brunacaiado@gmail.com

APÊNDICE C- ARTIGO SUBMETIDO

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/ Journal of the
Brazilian Society of Tropical Medicine- Manuscript ID RSBMT-2016-0517

**TITLE: MICROBIOTA SAMPLED FROM A POLLUTED STREAM IN RECIFE-
PE, BRAZIL AND ITS IMPORTANCE TO PUBLIC HEALTH**

SHORT TITLE: MICROBIOTA SAMPLED FROM A POLLUTED STREAM

Antonio Fernando da Purificação Júnior^[1], ***Livia Caroline Alexandre de ARAÚJO***^[2], ***Ana Catarina de Souza Lopes***^[3], ***Marcela de ARAÚJO Sobral***^[4], ***Gláucia Manoella de Souza Lima***^[4], ***Márcia Vanusa da Silva***^[5], ***Maria Tereza dos Santos CORREIA***^[5], ***Maria Betânia Melo de Oliveira***^{[5]*}

[1]. Programa de Pós-Graduação no Programa de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil; [2]. Programa de Pós-Graduação no Programa de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil; [3]. Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil; [4]. Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil; [5]. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

Corresponding author: Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira. Dept^o Bioquímica/
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n,
50670-901, Recife –PE, Brazil.

Phone: +55 (81) 2126 8547 R. 229; **Mobile:** 5581996639763

Fax: +55 (81) 2126 8576

e-mail: mbetaniem2008@gmail.com

