



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

RAFAEL AUGUSTO LOPES FRANCO

**Construção de um sistema de amplificação de sinal para
riboreguladores**

Araraquara, SP

2021

RAFAEL AUGUSTO LOPES FRANCO

**Construção de um sistema de amplificação de sinal para
riboreguladores**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre, área de pesquisa em Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli

Araraquara, SP

2021

F825c Franco, Rafael Augusto Lopes.
Construção de um sistema de amplificação de sinal para
riboreguladores / Rafael Augusto Lopes Franco. – Araraquara: [S.n.],
2021.
135 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Danielle Biscaro Pedrolli.

1. Biologia sintética. 2. Diagnóstico viral. 3. Circuito genético. 4.
Riboreguladores tipo *Toehold*. 5. Expressão gênica in vitro. I. Pedrolli,
Danielle Biscaro, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Construção de um sistema de amplificação de sinal para riboreguladores

AUTOR: RAFAEL AUGUSTO LOPES FRANCO

ORIENTADORA: DANIELLE BISCARO PEDROLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELLE BISCARO PEDROLI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Câmpus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. TIAGO ANTONIO DE OLIVEIRA MENDES (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular / Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. ADRIANO MONDINI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da
UNESP

Araraquara, 28 de junho de 2021

Agradecimentos

À Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli, pela orientação, paciência, pela oportunidade, pelos esclarecimentos e conselhos durante essa jornada do mestrado.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Sintética, pela convivência, pelos ensinamentos, apoio, orientação durante experimentos, risadas e momentos de descontração: Ana Luiza, Bruna, Celso, Daniel, Gabriela, Gabriel, Gracy, Isadora, Larissa, Laura, Cecília, Milca, Nathan, Paulo, Victor e Vitória.

Ao meu irmão Renan e amigos online e offline pelas horas de diversão, jogos e companheirismo que ajudaram a aliviar o estresse e espalhar, principalmente durante a pandemia.

Aos meus pais Maria e Nivaldo pelo exemplo, apoio, conforto, amor e dedicação

A todos os outros membros da minha família e amigos que me proporcionaram alegria e felicidade e que de certa forma me ajudaram nessa fase da minha vida.

Ao corpo técnico e discente do programa BBAF e do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, com destaque para o melhor técnico, o Flávio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Agradecimentos também à FAPESP, por incentivar a pesquisa no estado de São Paulo e pelo apoio na realização deste trabalho (2018/24272-3).

“O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, é a ilusão do conhecimento”

Stephen Hawking

Resumo

Dengue e Zika são arbovírus do gênero *Flavivirus* e representam um risco de infecção para milhões de pessoas no mundo. Em 2019, o número de casos prováveis para essas doenças no Brasil aumentou 650% no caso da Dengue e 65% para Zika quando comparado ao ano anterior. Mesmo com a grande incidência o número de casos confirmados em laboratório (por sorologia ou detecção nucleica) é baixo, principalmente por detecção nucleica. Atualmente o diagnóstico preciso para esses arbovírus é feito por técnicas de ELISA e RT-PCR, esses procedimentos exigem uma estrutura laboratorial específica e a manipulação por profissionais tornando-os dispendiosos e morosos. Além disso, a estrutura laboratorial exigida inviabiliza o diagnóstico em regiões remotas do Brasil e também em outros países tropicais afetados. Este trabalho visou desenvolver circuitos sintéticos de DNA que sirvam para a identificação rápida e simples do RNA viral *in vitro*. Riboreguladores específicos, do tipo *Toehold Switch*, previamente desenvolvidos no grupo de pesquisa SynBio AQA denominados *switch* DENV10550(2) e *switch* ZIKV1440(2.6) capazes de detectar o RNA viral (RNA *trigger*) referente, respectivamente, aos vírus da Dengue e da Zika foram utilizados. Os riboreguladores foram empregados em 3 diferentes estratégias de amplificação de sinal: uma baseada na protease Mf-Lon, outra baseada na enzima T7 RNA polimerase e a terceira com base em uma integrase do tipo serina. A funcionalidade dos dispositivos foi avaliada por reações de transcrição e tradução *in vitro* na presença do RNA *trigger* sintético específico ou inespecífico. A ativação dos sistemas T7 RNAPol foi medida pela atividade da proteína repórter luciferase. Nos dispositivos da protease Mf-Lon se utilizou a proteína fluorescente verde fusionada a cauda de degradação pdt#5 (específica à protease) para avaliar a resposta. Os ensaios com os sistemas Mf-Lon indicaram uma degradação baixa da proteína repórter, nota-se que a perda da fluorescência observada se deu, principalmente, por *quenching* da GFP após repetidos ciclos de excitação. Para o sistema amplificação baseado na integrase, devido a adversidades, não foi possível a construção da unidade de resposta. Construiu-se apenas os plasmídeos de detecção com a Int13 e com a Int9. Estes contêm o *switch* DENV10550(2) controlando o gene da integrase. Para o sistema T7 RNAPol, a amplitude de ativação máxima foi obtida com o dispositivo separado em dois plasmídeos e empregando o *switch* DENV10550(2), atingiu-se uma amplitude de ativação 2,29 vezes maior na presença de 500 ng de RNA *trigger* específico (*trigger* DENV10550) em relação à reação com o *trigger* inespecífico. O dispositivo com o *switch* ZIKV1440(2.6) neste mesmo sistema apresentou uma amplitude de ativação menor quando empregado o RNA *trigger* específico (*trigger* ZIKV1440) em relação à resposta com o *trigger* inespecífico (*trigger* DENV10550), devido a esse fato reavaliou-se os *switches* utilizados no trabalho e constatou-se que o *switch* ZIKV1440(2.6) não é funcional. A resposta do dispositivo T7 RNAPol com o *switch* DENV10550(2) mostra a funcionalidade e especificidade desta estratégia de sinalização, no entanto, a amplitude de ativação atingida foi pouco superior à alcançada no dispositivo com circuito direto de resposta.

Palavra-chave: Biologia sintética, diagnóstico viral, circuito genético, *Toehold switch*, expressão gênica *in vitro*.

Abstract

Dengue and Zika are arboviruses of the Flavivirus genus and represent a risk of infection for millions of people worldwide. In Brazil, 2019, the number of reports for these diseases increased by 650% for Dengue and 65% for Zika compared to the previous year. Even with the high incidence the number of precise confirmed cases (by serology or molecular detection) is low. Currently, the precise diagnosis of these arboviruses is made by techniques such as ELISA and RT-PCR, that require particular laboratory resources and the handling by technicians, which makes the diagnosis expensive and time-consuming. In addition, the demanded laboratory structure makes the diagnosis impracticable in remote regions of Brazil and also in other affected tropical countries. This work aimed to develop a synthetic DNA circuit for the rapid and simple identification of viral RNA from Zika and Dengue in an *in vitro* gene expression system. Toehold Switch previously developed in the SynBio AQA research group (called switch DENV10550(2) and switch ZIKV1440(2.6)) capable of detecting, individually, the viral RNA (trigger RNA) to the two diseases were employed. These riboregulators were used in 3 different signal amplification strategies: one based on the Mf-Lon protease, another based on the T7 RNA polymerase enzyme, and the third in a system using serine-type integrase. *In vitro* gene expression reactions are performed to evaluate the response of the synthetic circuits in the presence of specific and non-specific trigger RNA. The activation of the T7 RNAPol systems was measured by the activity of reporter protein luciferase. In the evaluation of the Mf-Lon protease circuit, the green fluorescent protein fused to the degradation tail pdt#5 was used to assess the response. The Mf-Lon protease system *in vitro* gene expression assays did not indicate high degradation rates of the reporter protein, the fluorescence loss observed was, mainly, due to GFP quenching after repeated excitation cycles. For the signal amplification system based on serine-type integrase, due to several adversities, it was not possible to build the response unit. Only the detection plasmids with the integrase Int13 and Int9 were constructed. These contain the DENV10550(2) switch controlling the integrase gene. The highest fold change observed in the T7 RNAPol system was with the circuit separated in two plasmids and employing the DENV10550(2) switch, a response 2.29 times greater was achieved in the presence of 500 ng of RNA specific trigger (trigger DENV10550) in comparison to the response with the non-specific RNA. The T7 RNAPol system with the ZIKV1440(2.6) showed a smaller fold change to the specific RNA trigger (trigger ZIKV1440) in relation to the response with the non-specific RNA trigger (trigger DENV10550), due to this fact the switches used in the work were re-evaluated, and it was found that the ZIKV1440(2.6) switch is not functional. The response of the T7 RNAPol device with the DENV10550(2) switch shows the functionality and specificity of this signaling strategy, however, the fold change achieved was slightly higher than that obtained in the device with a direct response circuit.

Keywords: Synthetic biology, viral diagnosis, genetic circuit, Toehold switch, *in vitro* gene expression.

Lista de figuras

Figura 1 Genoma do vírus da dengue, destaque das 3 proteínas estruturais (C, M e E) e as 7 não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5)	20
Figura 2 Distribuição do número de casos suspeitos de dengue por semana epidemiológica nos anos de 2019 e 2020, com destaque para a semana 11 de cada ano	25
Figura 3 Janela de detecção molecular de um indivíduo infectado.....	27
Figura 4 Esquema do funcionamento da detecção SHERLOCK	31
Figura 5 Esquema ilustrando o funcionamento do Riboregulador	33
Figura 6 Representação da ação de uma integrase do tipo serina.....	35
Figura 7 Caracterização da atividade da protease Mf-Lon in vivo frente a diferentes caudas de degradação.	37
Figura 8 Alinhamento de múltiplas sequências comparando a sequência do RNA trigger DENV10550 com os genomas referência (RefSeq) dos 4 sorotipos virais da Dengue usando a plataforma NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer.....	39
Figura 9 Alinhamento comparando a sequência do RNA trigger ZIKV1440 com o genoma referência (RefSeq) da linhagem asiática do ZIKV usando a plataforma NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer	39
Figura 10 Amplitude de ativação do switch DENV10550(2).....	40
Figura 11 Amplitude de ativação do switch ZIKV1440(2.6).....	41
Figura 12 Esquema ilustrativo do plasmídeo pSB1C3	45
Figura 13 Esquema ilustrativo do plasmídeo pT7luc(GCA)_ZIKV1440-Switch.2.6_linker	46
Figura 14 Esquema ilustrativo do plasmídeo pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker	47
Figura 15 Esquema ilustrativo do plasmídeo pZE27_GFP.pdt#5	48
Figura 16 Esquema ilustrativo do plasmídeo pSB1C3_spoVG_T7RNAPol....	48
Figura 17 Esquema ilustrativo do plasmídeo pSB1C3_AraC-pBAD_EPICluc.	49
Figura 18 Esquema ilustrativo do plasmídeo pECG_mCherry-pdt#3.....	50
Figura 19 Esquema ilustrativo da clonagem BioBrick	52

Figura 20 Esquema ilustrativo do funcionamento do sistema de amplificação de sinal baseado na atividade da T7 RNAPol.....	61
Figura 21 Esquema ilustrativo do funcionamento do sistema sinalização utilizando a protease mf-Lon como gene repórter.....	64
Figura 22 Esquema ilustrativo do funcionamento do sistema de amplificação de sinal baseado na atividade flip recombinase de uma integrase de serina.....	67
Figura 23 Representação geral do design de uma das sequências sintéticas de DNA para o sistema de amplificação de sinal da integrase desenhado para síntese.	69
Figura 24 Representação da estrutura secundária do switch DENV10550(2) livre (A), referente ao estado OFF, e da estrutura após pareamento com trigger específico (B), referente ao estado ON	77
Figura 25 Representação da estrutura secundária do switch ZIKV1440(2.6) livre (A), referente ao estado OFF, e da estrutura após pareamento com trigger específico (B), referente ao estado ON	78
Figura 26 Comparação de nível de fluorescência entre o lisado de uma cultura utilizando células transformadas com o plasmídeo pZE27_GFP.pdt#5 e a mesma linhagem sem plasmídeo (Controle).....	82
Figura 27 Ensaio de degradação da GFP.pdt#5 pela protease Mf-Lon	83
Figura 28 Ensaio de avaliação da protease Mf-Lon.....	84
Figura 29 SDS-PAGE dos ensaios in vitro da protease mf-Lon.....	85
Figura 30 Taxa de ativação gênica do sistema de amplificação T7 com o switch DENV10550(2) com reação incubada a 30°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica realizados em triplicata complementados com 500 ng de trigger específico DENV10550 (amarelo), com 500 ng de trigger inespecífico ZIKV1440 (laranja), e reação controle sem RNA trigger (azul). Os valores de luminescência foram normalizados pelo controle, o tempo está expresso em minutos (min). Análise de variância ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação por teste de Tukey (valor $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor.	88
Figura 31 Taxa de ativação gênica do gene repórter no sistema de amplificação T7 com o switch DENV10550(2) com reação incubada a 37°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica realizados complementados com 500 ng de trigger específico DENV10550 (amarelo), ou com 500 ng de trigger inespecífico (laranja), e sem RNA trigger, controle (azul). Os valores	

de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger, o tempo está expresso em minutos (min). Fonte: O próprio autor.89

Figura 32 Gráfico das médias de luminescência do ensaio de expressão gênica com o sistema T7RNAPol com o switch DENV10550(2) incubada a 25°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica complementados com 1000 ng de trigger inespecífico ZIKV1440 (laranja), 1000 ng de trigger específico DENV10550 (amarelo), e sem RNA trigger, controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger, o tempo está expresso em minutos (min). Análise de variância ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação por teste de Tukey (95% de confiança) foram avaliados individualmente para cada intervalo de tempo. Fonte: O próprio autor.90

Figura 33 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7 RNA pol com o switch DENV10550(2) incubado a 25°C empregando 1000 ng de trigger. Intervalo de confiança de 95%. Aos 10 minutos de incubação não há diferença significativa entre as médias de luminescência entre DENV10550 e ZIKV1440 (gráfico superior). Já aos 20 minutos a taxa de ativação do sistema quando adicionado o RNA alvo específico é significativamente diferente de quando se adiciona o trigger inespecífico (gráfico inferior). Fonte: O próprio autor.91

Figura 34 Luminescência média do ensaio de expressão gênica com o sistema de amplificação da T7RNAPol 2p 50:10 com o switch DENV10550(2) incubada a 30°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica complementados com 500 ng de trigger inespecífico, definido pelos triggers ZIKV1440 (laranja) e ZIKV9452 (verde), ou com 500 ng de trigger específico, definido como DENV10550 (amarelo), e sem RNA trigger, controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger, o tempo está expresso em minutos (min). Análise de variância ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação por teste de Tukey (valor $p < 0,05$) foram avaliados individualmente para cada intervalo de tempo. Fonte: O próprio autor92

Figura 35 Amplitude de expressão do sistema T7RNAPol 2p 10:100 com o switch DENV10550(2) empregando 500 ng de trigger e de incubação curta. Reação incubada a 30°C, dados normalizados pelo controle. Ensaio de expressão gênica realizados com adição de 500 ng de trigger inespecífico ou ZIKV9452 (em verde) e

específico ou DENV10550 (amarelo). O controle (azul) se refere à reação sem adição de RNA trigger. Aos 10 minutos, a amplitude de ativação foi 1,22 maior na reação com RNA alvo cognato ao riboregulador, aumentando para 1,17 aos 20 minutos e atingindo uma expressão gênica 2,29 vezes maior em relação à reação com RNA ZIKV9452 aos 30 minutos. O cálculo da diferença estatística (feito por ANOVA (valor $p < 0,05$), comparação por teste de Tukey) foram realizados individualmente para cada intervalo. Fonte: O próprio autor93

Figura 36 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7RNApol 2p 10:100 com o switch DENV10550(2) a 30°C de incubação curta e empregando 500 ng de trigger. Intervalo de confiança de 95%. Constata-se diferença significativa entre as médias de luminescência entre DENV10550 e ZIKV9452 em todos os intervalos (10 min, 20 min e 30 min). Fonte: O próprio autor.94

Figura 37 Amplitude de expressão do sistema T7RNApol 2p 10:100 com o switch DENV10550(2) empregando 500 ng de trigger e de incubação longa. Reação incubada a 30°C, dados normalizados pelo controle. Ensaios de expressão gênica realizados com adição de 500 ng de trigger inespecífico ZIKV9452 (em laranja) e específico DENV10550 (amarelo). O controle (azul) se refere à reação sem adição de RNA trigger. Com 1 hora de reação a amplitude de ativação foi 1,64 vezes maior na reação com RNA alvo cognato ao riboregulador, aumentando para 2,10 com 2 horas de incubação quando comparado a reação com RNA ZIKV9452. O cálculo da diferença estatística por ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação da diferença média por teste de Tukey (valor $p < 0,05$) foram avaliados individualmente para cada intervalo. Fonte: O próprio autor.95

Figura 38 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7RNApol 2p (10-100) com o switch DENV10550(2) a 30°C e de incubação longa e empregando 500 ng de trigger. Intervalo de confiança de 95%. Constata-se diferença significativa entre as médias de luminescência entre DENV10550 e ZIKV9452 nos dois intervalos avaliados (1 e 2 horas). Fonte: O próprio autor.96

Figura 39 Médias de luminescência do ensaio de expressão gênica com o sistema em plasmídeo único da T7 RNA pol com o switch ZIKV1440(2.6) incubada a 37°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios complementados com 500 ng de trigger específico, definido como ZIKV1440 (laranja), ou com 500 ng de trigger inespecífico, definido como DENV10550 (amarelo), e sem RNA trigger, controle

(azul). Os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger, o tempo está expresso em minutos (min). Fonte: O próprio autor.97

Figura 40 Gráfico das médias de luminescência do ensaio de expressão gênica com o dispositivo T7 RNA pol em plasmídeo único com o switch ZIKV1440(2.6) incubada a 25°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica realizados complementados com 1000 ng de trigger específico, definido como ZIKV1440 (laranja), ou com 1000 ng de trigger inespecífico, definido como DENV10550 (amarelo), e sem RNA trigger, controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger, o tempo está expresso em minutos (min). Análise estatística ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação por teste de Tukey (valor $p < 0,05$) foram avaliados individualmente para cada intervalo. Fonte: O próprio autor.....98

Figura 41 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7 RNA pol com o switch ZIKV1440(2.6) a 25°C aplicando 500 ng de trigger. Intervalo de confiança de 95%. Aos 10 minutos, apenas o controle apresentou médias significativamente diferente dos demais tratamentos, com 20 minutos as reações com DENV10550 e ZIKV1440 apontam médias significativamente diferentes entre si. Fonte: O próprio autor.....99

Figura 42 Luminescência média do ensaio de expressão gênica dispositivo T7 RNA pol 2p 50:10 com o switch ZIKV1440(2.6) adicionando 500 ng de trigger. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica complementados com 500 ng de trigger inespecífico, DENV10550 (amarelo), ou trigger específico, ZIKV1440 (laranja), e sem RNA trigger, reação controle (azul). As reações foram realizadas em quadruplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger. O cálculo da diferença estatística (ANOVA (valor $p < 0,05$), comparação por teste de Tukey) foram avaliados individualmente para cada intervalo Fonte: O próprio autor.....100

Figura 43 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7 RNA pol 2p (50-10) com o switch ZIKV1440(2.6) aplicando 500 ng de trigger. Intervalo de confiança de 95%, todos os intervalos de comparação entre tratamentos apresentaram médias sem diferença significativa. Fonte: O próprio autor.....101

Figura 44 Luminescência média do ensaio de expressão gênica com o sistema T7 RNA pol 2p 10:100 com o switch ZIKV1440(2.6) aplicando 500 ng de trigger. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica complementados com 500 ng de trigger inespecífico, DENV10550 (amarelo), ou com

500 ng de trigger específico, ZIKV1440 (laranja), e sem RNA trigger, reação controle (azul). As reações foram realizadas em quadruplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger. O cálculo da diferença estatística por ANOVA (valor $p < 0,05$), comparação por teste de Tukey (95% de confiança) foram avaliados individualmente para cada intervalo Fonte: O próprio autor.....102

Figura 45 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7 RNA pol 2p 10:100 com o switch ZIKV1440(2.6) aplicando 500 ng de trigger. Intervalo de confiança de 95%, todos os intervalos de comparação entre tratamentos apresentaram médias sem diferença significativa. Fonte: O próprio autor.....102

Figura 46 Amplitude de ativação do plasmídeo pT7luc(GCA)_ZIKV1440Switch(2.6)_linker com 5, 10 e 20 min de incubação. Resultados de luminescência normalizados dos ensaios a complementados com 500 ng de trigger específico (ZIKV1440), em laranja, e inespecífico (DENV10550), em amarelo. Dados normalizados pelo RNA trigger inespecífico Fonte: O próprio autor104

Figura 47 Amplitude de ativação do plasmídeo pT7luc(GCA)_ZIKV1440Switch(2.6)_linker com 30, 60 e 120 min de incubação. Resultados de luminescência normalizados dos ensaios complementados com 500 ng de trigger específico (ZIKV1440), em laranja, e inespecífico (DENV10550), em amarelo. Dados normalizados pelo RNA trigger inespecífico Fonte: O próprio autor.105

Figura 48 Amplitude de ativação do switch ZIKV1440(2.6) utilizando o plasmídeo pSB1C3_ ZIKV1440Switch(2.6)_EPICluc e aplicando 500 ng de trigger. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica in vitro a 30 °C e complementados com 500 ng de trigger inespecífico, DENV10550 (amarelo), trigger específico, ZIKV1440 (laranja), e sem RNA trigger, reação controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger. O cálculo da diferença estatística foi feito por ANOVA (valor $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor106

Figura 49 Amplitude de ativação do switch ZIKV1440(2.6) utilizando o plasmídeo pSB1C3_ ZIKV1440Switch(2.6)_EPICluc e aplicando 1000 ng de trigger. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica in vitro a 30 °C e complementados com 1000 ng de trigger inespecífico, DENV10550 (amarelo), ou trigger específico, ZIKV1440 (laranja), e sem RNA trigger, reação

controle (azul). As reações foram realizadas em quadruplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger. O cálculo da diferença estatística foi feito por ANOVA (valor $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor107

Figura 50 Amplitude de ativação do switch DENV10550(2) utilizando o plasmídeo 10 ng do pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica in vitro a 30 °C e complementados com 500 ng de trigger específico, DENV10550 (amarelo), trigger inespecífico, ZIKV1440 (laranja), e sem RNA trigger, reação controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger. Análise estatística por ANOVA (valor $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor108

Figura 51 Teste de Tukey para ensaio com 10 ng do plasmídeo pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker aplicando 500 ng de trigger. Intervalo de confiança de 95%, os tratamentos com o RNA alvo específico, DENV10550, apresentaram médias significativamente diferentes nos dois intervalos (10 e 20 minutos) entre os demais tratamentos (Controle e ZIKV1440). Fonte: O próprio autor109

Figura 52 Amplitude de ativação do switch DENV10550(2) utilizando o plasmídeo 0,1 ng do pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica in vitro a 30°C e complementados com 500 ng de trigger inespecífico, ZIKV9452 (verde), ou trigger específico, DENV10550 (amarelo), e sem RNA trigger, reação controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA trigger. O cálculo da variância foi feito por ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação por teste de Tukey (valor $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor110

Figura 53 Teste de Tukey para ensaio com 0,1 ng do plasmídeo pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker aplicando 500 ng de trigger. Intervalo de confiança de 95%, os tratamentos com o RNA alvo específico, DENV10550, apresentaram médias significativamente diferentes nos dois intervalos (10 e 20 minutos) entre os demais tratamentos (Controle e ZIKV9452). Fonte: O próprio autor.111

Figura 54 Comparação da digestão dos plasmídeos pSB1C3_RBS-EPICluc e pSB1C3_att(Int13)_EPICluc. Na figura a construção pSB1C3_RBS-EPICluc é nomeado 412 e o vetor pSB1C3_att(Int13)_EPICluc é denominado 474. O poço identificado 412 E+P é referente a digestão de pSB1C3_RBS-EPICluc com as

enzimas EcoRI e PstI; já o poço 474 E+P é da digestão de pSB1C3_att(Int13)_EPICluc também com EcoRI e PstI. Os dois outros poços são das digestões apenas com EcoRI, no entanto não se observa diferença do padrão de banda dos plasmídeos linearizados, afinal o inserto attB-PT7-attP(Int13) tem apenas 165 pb. Foram destacadas as bandas de 2030 pb pertencente ao vetor pSB1C3 vazio e as bandas de 1760 relativa ao inserto RBS-EPICluc, além da banda de 1930 pb do inserto attB-PT7-attP(Int13)_EPICluc. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA ladder. Fonte: O próprio autor.....113

Figura 55 Alinhamento do sequenciamento da construção pSB1C3_att(Int13)_EPICluc. Resultado do sequenciamento com primer 50 reverse. São destacados, na ordem, a sequência nucleica da parte final do gene da luciferase EPICluc (laranja) e do terminador T500 (marrom). Fonte: O próprio autor, imagens geradas no software Serial Cloner114

Figura 56 Eletroforese em gel agarose da PCR do inserto att(Int13)_EPICluc. Foram destacadas as bandas de 2000 e 1500 pb do marcador de peso molecular, observa-se uma banda de 1930 pb referente ao amplicon att(Int13)_EPICluc. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA ladder. Fonte: O próprio autor.115

Figura 57 Gel da digestão do plasmídeo pSB1C3_att(Int13)_EPICluc. Foram utilizadas as enzimas de restrição EcoRI e PstI, observa-se uma banda de aproximadamente 2030 pb referente ao plasmídeo vazio linearizado e uma banda de aproximadamente 1930 pb referente ao inserto att(Int13)_EPICluc. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA ladder. Fonte: O próprio autor.115

Figura 58 Gel do produto da PCR de pSB1C3_att(Int13)_EPICluc amplificado com os primers 49 fw e 50 rv. Foram destacadas as bandas de 1500, 2000, 3000 e 4000 pb do marcador de peso molecular. Observa-se uma banda na PCR de 1930 pb (destacada) supostamente referente ao amplicon attB-PT7-attP(Int13)_EPICluc e uma outra banda maior mais fraca entre 3000 e 4000 pb. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA ladder. Fonte: O próprio autor.....116

Figura 59 Alinhamento do sequenciamento com o desenho do plasmídeo pSB1C3_att(Int13)_EPICluc. Apresentado o resultado do primer foward. São destacados, na ordem, as sequências nucleicas do BB prefixo (rosa escuro), do sítio attB (verde), do promotor T7 invertido (ciano), do sítio attP (castanho), RBS (rosa

claro) e o início do gene da EPICluc (laranja). Fonte: O próprio autor, imagens geradas no software Serial Cloner.117

Figura 60 Alinhamento do sequenciamento com a construção pSB1C3_RBS-EPICluc. Apresenta-se o resultado do primer forward. São destacados, na ordem, as sequências nucleicas do BB prefixo (roxo), do RBS (rosa claro) e o início do gene da EPICluc (laranja). Fonte: O próprio autor, imagens geradas no software Serial Cloner.118

Sumário

1.	Introdução.....	20
1.1.	Sintomatologia da Dengue e Zika	21
1.1.1.	Dengue e Zika no Brasil.....	23
1.2.	Diagnóstico	26
1.2.1.	Detecção indireta por sorológica.....	28
1.2.2.	Detecção direta.....	29
1.3.	<i>Toehold</i> switch	33
1.4.	Integrases sítio-específicas.....	35
1.5.	Protease Mf-Lon.....	36
1.6.	Desafios científicos e tecnológicos	37
2.	Objetivo	41
2.1.	Objetivos específicos	41
3.	Material e Métodos	42
3.1.	Linhagens celulares	42
3.2.	Meio de cultura.....	42
3.2.1.	Meio Luria-Bertani.....	42
3.2.2.	Meio SOC	42
3.3.	Soluções	43
3.4.	Plasmídeos e oligonucleotídeos.....	45
3.5.	Clonagem gênica	52
3.5.1.	Reação de amplificação em cadeia (PCR)	53
3.5.2.	Digestão enzimática.....	54
3.5.3.	Precipitação do DNA utilizando etanol e acetato de sódio 3M.....	55
3.5.4.	Ligação com T4 DNA ligase.....	56
3.5.5.	Transformação em <i>E. coli</i> quimicamente competente por choque térmico	57
3.6.	Confirmação da clonagem	57

3.6.1.	PCR de colônia	57
3.6.2.	Eletroforese em gel de agarose	59
3.6.3.	Sequenciamento de DNA.....	59
3.7.	Sistemas de amplificação de sinal baseados na T7 RNA polimerase 60	
3.8.	Sistemas de sinalização empregando a protease <i>mf-Lon</i>	63
3.8.1.	Produção de GFP.pdt#5	65
3.8.2.	SDS-PAGE	66
3.9.	Sistemas de amplificação de sinal baseados em integrases	67
3.10.	Análise <i>in silico</i>	71
3.11.	Teste de funcionalidade dos sistemas de amplificação de sinal	72
3.11.1.	Transcrição <i>in vitro</i>	72
3.11.2.	Ensaio de expressão <i>in vitro</i>	73
3.12.	Análise estatística	75
4.	Resultados e Discussão	76
4.1.	Análise <i>in silico</i>	76
4.2.	Teste de funcionalidade	81
4.2.1.	Sistema de sinalização baseado na protease <i>Mf-Lon</i>	81
4.2.2.	Sistema de amplificação de sinal baseado na T7RNAPol.....	86
4.2.3.	Reavaliação dos <i>switches</i>	103
4.2.4.	Sistema de amplificação baseado na integrase 13.....	111
5.	Conclusões.....	118
6.	Referências bibliográficas.....	120

1. Introdução

A doença da Dengue e a doença da Zika são infecções sistêmicas causadas, respectivamente, pelo vírus da Dengue (DENV) e pelo vírus da Zika (ZIKV), esses vírus pertencem à família *Flaviviridae* e o gênero *Flavivirus*, assim como com o vírus do Nilo Ocidental (VNO), o vírus da Febre Amarela (YFV), vírus Rocio (ROC) e o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV). Todos possuindo um genoma de fita simples de RNA (GOULD; SOLOMON, 2008; RODRIGUES et al., 2010). Os vírus DENV e ZIKV são transmitidos aos humanos principalmente pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, tendo como principal vetor o mosquito *Aedes aegypti*, devido a esta transmissão pela hematofagia de um artrópode estes vírus também são classificados como arbovírus (SIMMONS et al., 2012; PLOURDE; BLOCH, 2016).

Estes flavivírus apresentam um virião envelopado com diâmetro aproximado de 40-50 nm e um genoma de RNA de fita simples com uma polaridade positiva de cerca de 11 kb de tamanho (Figura 1). O material genético codifica uma única poliproteína, que consiste de 3 proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais, sendo a ORF (*open reading frame*) flanqueada por regiões não traduzidas, conhecidas como UTR. Sua figura, inclusive, traz a representação da 5'UTR e 3'UTR. O genoma é envolto por um nucleocapsídeo composto da proteína estrutural C, sendo circundado por uma dupla camada lipídica contendo as proteínas estruturais de membrana (M) e de envelope (E). A proteína E é a principal proteína estrutural sendo responsável pela ligação aos receptores celulares para a entrada do vírus nas células hospedeiras. Devido a seu papel na infecção, esta proteína contém os epítomos cruciais para a neutralização do vírus por anticorpos desenvolvidos após a infecção (GUZMAN et al., 2010; BAZ; BOIVIN, 2019)

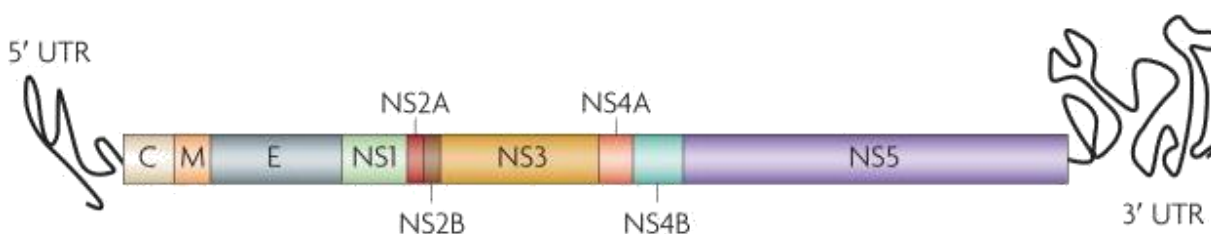


Figura 1 Genoma do vírus da dengue, destaque das 3 proteínas estruturais (C, M e E) e as 7 não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Fonte: Guzman et al., 2010

As proteínas não estruturais (NS) estão relacionadas a diversos papéis, dentre eles a replicação viral e montagem da partícula viral. Estas proteínas são nomeadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (GUZMAN et al., 2010). A proteína NS5 é a maior, composta por aproximadamente 900 aminoácidos, e mais conservada entre flavivírus, apresentando uma metiltransferase (MTase) na porção N-terminal e uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) no C-terminal (CHOI et al., 2009). A proteína não estrutural 1 (NS1) é usada como indicador de gravidade da doença

1.1. Sintomatologia da Dengue e Zika

A dengue em humanos é causada por quatro imunologicamente diferentes sorotipos virais, nomeados DENV 1 a 4 (SIMMONS et al., 2012). Estima-se que aproximadamente 390 milhões de casos de dengue ocorrem anualmente em todo o mundo e apenas no ano de 2010 houve 96 milhões de infecções da doença com algum grau de manifestação clínica (BHATT et al., 2013). No entanto, sabe-se que grande parte dos infectados (75%) não desenvolve manifestações clínicas, ou seja, são assintomáticos, sendo que os casos sintomáticos englobam apenas 25% dos infectados (BHATT et al., 2013).

A manifestação desta doença é caracterizada por sinais e sintomas que podem evoluir de um quadro mais simples, para quadros com sinais de alarme e, por fim, para a dengue grave. Estas três podem ser diferenciadas pela severidade dos sintomas apresentados, sendo elas:

- a dengue sem sinais de alarme, em que infectados apresentam sinais de febre aguda, dores de cabeça, náusea e dor nas articulações;
- a dengue com sinais de alarme, caracterizada pelos sintomas anteriores e podendo apresentar também dor abdominal intensa, vômito persistente, acúmulo de fluidos, sangramento de mucosa, hipotensão postural, aumento do fígado e/ou aumento progressivo do hematócrito;
- a dengue severa, marcada pela evolução dos sintomas da dengue com sinais de alarme, podendo levar a manifestações de choque ou dificuldade respiratória devido a vazamento de plasma para os espaços

intersticiais devido ao aumento da permeabilidade vascular, fruto de uma cascada de citocinas, além sangramento clinicamente severo e comprometimento grave de órgãos (WHO, 2009; PAHO, 2016).

Observa-se também que o risco de manifestação da dengue com sinais de alarme aumenta com a incidência de infecções heterotípicas e de até mesmo devido a infecções prévias por outros flavivírus, devido ao fenômeno de intensificação dependente de anticorpos (do inglês, *antibody-dependent enhancement*) (MORRONE et al., 2019).

Durante a fase aguda da infecção com DENV, é possível detectar o vírus, bem como a proteína não estrutural 1 (NS1), utilizada como base em muitos diagnósticos comerciais para dengue. A alta viremia na fase aguda pode ser associada a manifestações clínicas mais severas da doença (SIMMONS et al., 2012; BRASIL, 2016)

Já quanto a Zika, preocupações com a saúde pública global relacionadas ao ZIKV se agravaram após relatos descritos no Brasil em 2015, em que se revelou que a doença pode ser um agente causador de defeitos congênitos em recém-nascidos quando gestantes são infectadas durante a gravidez (OLIVEIRA MELO et al., 2016), sendo relatado também a possibilidade de desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré após infecção pelo vírus, assim como observado na epidemia de Zika na Polinésia Francesa entre 2013 e 2014 (CAO-LORMEAU et al., 2016). Estas ocorrências levantaram a suspeita de um tropismo do vírus ao sistema nervoso central. O ZIKV foi inicialmente isolado em 1947 de um macaco febril próximo à Floresta de Zika na Uganda, fato que deu origem ao nome do vírus, e durante 60 anos houve poucos relatos desta doença em humanos (HAYES, 2009). A partir de 2007, surtos desta doença foram relatados na Ásia, alcançando a América em 2014-2015 (OLIVEIRA MELO et al., 2016).

Estudos filogenéticos mencionam duas linhagens do vírus da Zika, a linhagem africana (subdividida em África do Leste e África do Oeste) e a asiática (DUFF et al., 2009), sendo a linhagem asiática identificada como a causadora do surto no Brasil (OLIVEIRA MELO et al., 2016). Em 2019, a partir da vigilância de mosquitos transmissores da doença, identificou-se a linhagem africana no Brasil e também se

constatou sua circulação entre macacos (KASPRZYKOWSKI et al., 2020), levantando um alerta para um possível novo surto da doença.

Assim como na dengue parte dos infectados por Zika não desenvolve sintomas, a infecção do ZIKV no organismo humano é considerada de manifestação clínica leve com cerca de 80% dos casos diagnosticados sendo assintomáticos (NUNES et al., 2016), ainda assim gestantes infectadas com ou sem sintomas podem transmitir o vírus para o feto durante a gestação, podendo levar à microcefalia e problemas motores nos recém-nascidos (ALBUQUERQUE et al., 2018).

Para os sintomáticos os sintomas mais comuns são: exantema maculopapular, mialgia, dor de cabeça, artralgia, febre e hiperemia conjuntival não purulenta e sem prurido, dor de garganta, tosse, vômitos foram relatados com menor frequência. A resposta do corpo ao vírus varia devido a diversos fatores, por exemplo, em uma infecção primária de Zika em pacientes que nunca foram acometidos por outro flavivírus, anticorpos IgG apresentam uma resposta específica e forte, no entanto a resposta em indivíduos previamente expostos a outros flavivírus é menos específica embora ainda forte (LANCIOTTI et al., 2008), fato correlacionado a manifestação de sintomas mais grave. Este último cenário deve ser o mais próximo da realidade brasileira, já que há no Brasil diversas regiões endêmicas onde comumente existe a cocirculação de diferentes arbovírus.

A expansão do ZIKV no Ocidente, bem como sua capacidade de ser transmitido verticalmente, sexualmente e possivelmente através de transfusões de sangue (PLOURDE; BLOCH, 2016), aumenta a necessidade de uma resposta rápida e assertiva dos sistemas de saúde a essa enfermidade. Além disso, a possibilidade de sequelas causadas pelo vírus em recém-nascidos amplia a necessidade de um teste rápido e não invasivo para a detecção de ZIKV que possa ser realizado durante toda a gestação.

1.1.1. Dengue e Zika no Brasil

No período de 2003 a maio de 2019, foram notificados 11.137.664 casos prováveis de Dengue no Brasil, casos prováveis são aqueles notificados ao Ministério da Saúde excluindo-se os descartados. Observando a distribuição dos casos prováveis nesses 16 anos pode-se destacar cinco anos pelo alto número de casos: 2010, 2013, 2015, 2016 e 2019. Os surtos epidêmicos em 2015 e 2016 são marcados

também pela introdução dos novos arbovírus Chikungunya e Zika no território nacional (BRASIL, 2019). Além disso, verifica-se um aumento do número de casos prováveis de Dengue e Zika em 2019 em relação ao ano anterior. Os números de casos prováveis nacionais (Tabela 1) mostram uma variação de +650,75% para Dengue e de +61,4% para Zika em relação ao ano anterior, com destaque para as regiões sul (+3699,6%) e sudeste (+1759,2%) quanto aos casos de Dengue (BRASIL, 2020).

Tabela 1 Número de casos prováveis, variação percentual e incidência de Dengue e Zika. Dados comparativos entre 2018 e 2019 (até a SE 52 para Dengue e até SE 50 para Zika), apresentados por região e total no Brasil. Fonte: adaptado de Brasil, 2020.

Região	Casos prováveis (n)				Variação %		Incidência (casos/100 mil habitantes)			
	2018		2019				2018		2019	
	Zika	Dengue	Zika	Dengue	Zika	Dengue	Zika	Dengue	Zika	Dengue
Norte	662	10.449	790	36.097	19,3	245,4	3,6	57,5	4,3	195,8
Nordeste	1.835	55.924	5.406	214.965	194,6	284,3	3,2	98,5	9,5	376,7
Sudeste	2.618	55.106	3.525	1.024.548	34,6	1.759,2	3	62,8	4,0	1.159,4
Sul	20	1303	106	49.509	430	3.699,6	0,1	4,4	0,4	165,2
Centro-oeste	1.534	83.009	941	219.868	-38,6	164,8	9,5	516	5,8	1.349,1
Brasil	6.669	205.791	10.768	1.544.987	61,4	650,75	3,2	98,7	5,1	735,2

Em 2020, foram notificados 987.173 casos prováveis de Dengue até a Semana Epidemiológica (SE) 53, referente ao período de 29/12/2019 a 02/01/2021, e 7.387 casos de Zika até a SE 51 (29/12/2019 a 29/12/2020). Analisando a progressão de ocorrências de Dengue em 2020 notava-se uma curva de casos maior que no ano de 2019 até a SE 11 (Figura 2) (BRASIL, 2021; PAHO, 2020). Todavia, a partir deste marco a curva começou a retroceder em comparação ao ano anterior, a Secretaria de Vigilância em Saúde atribui essa diminuição de casos a mobilização das equipes de vigilância estaduais para o combate da pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, resultando uma subnotificação dos casos de diversos arbovírus (BRASIL, 2021).

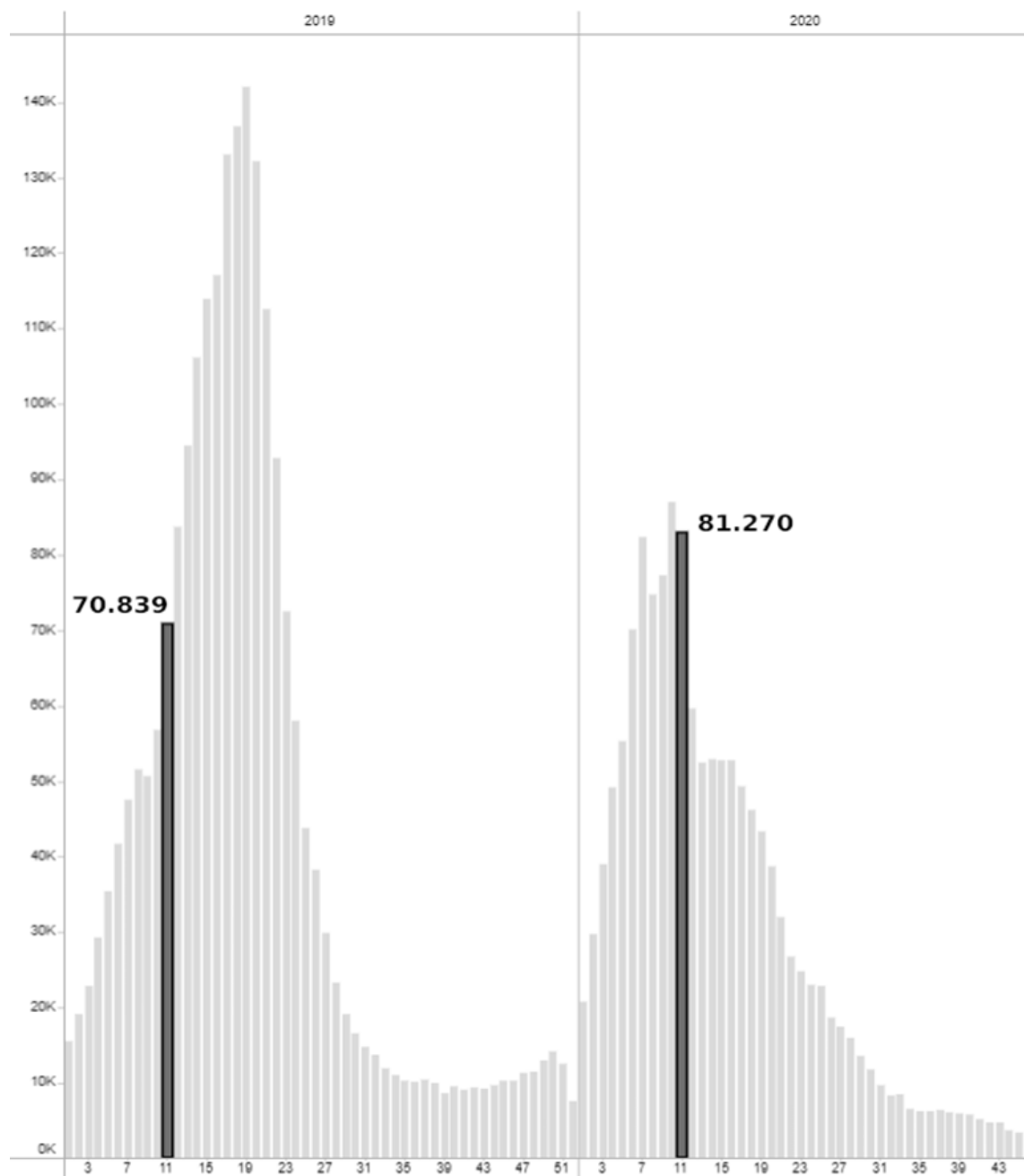


Figura 2 Distribuição do número de casos suspeitos de dengue por semana epidemiológica nos anos de 2019 e 2020, com destaque para a semana 11 de cada ano. Fonte: OPS, 2020.

Com o grande número de casos, sinalizando a endemia no Brasil tanto para Zika quanto para Dengue, faz-se necessária a confirmação dessas doenças por modos mais precisos que o diagnóstico clínico-epidemiológico, em que se observa os sintomas do paciente e dados epidemiológicos da região para apontar um diagnóstico. A tabela 2 mostra o número de casos confirmados laboratorialmente no Brasil, pode-se observar entre 2018 e 2019 uma média acima de 80% de casos confirmados para

dengue e uma média próxima de 30% para Zika, indicando uma demanda para a identificação dessas doenças (Tabela 2).

Tabela 2 Relação de casos suspeitos e casos confirmados laboratorialmente (sorologia e detecção molecular) para Zika e Dengue por ano. Fonte: PAHO apud Brasil 2021, adaptado.

Ano	Nº de casos		Casos confirmados		Casos confirmados (%)	
	Zika	Dengue	Zika	Dengue	Zika	Dengue
2018	6.669	205.791	1.379	174.724	21%	85%
2019	10.768	1.544.987	3.943	1.244.089	37%	81%
2020	7.387	987.173	-	329.339	-	33,36%

Em 2020, o número de casos de Dengue diagnosticados precisamente por sorologia ou detecção nucleica/viral foi de apenas um terço dos casos prováveis relatados pelo Ministério da Saúde. Das 329.339 amostras com diagnóstico, 8,3% (27.273) foram verificadas por detecção direta (RT-PCR ou isolamento viral), destes pode-se confirmar o sorotipo viral em 46,8% das amostras e constatou-se que o estado de São Paulo é único estado brasileiro em que se observa os 4 diferentes sorotipos da Dengue. Do montante restante de amostras avaliadas, 36,5% apresentaram positividade sorológica, assim sendo, dos 302.066 exames sorológicos (IgM) realizados no período, 110.141 tiveram resultados confirmando a infecção por Dengue (BRASIL, 2021).

A redução no diagnóstico de Dengue em 2020 evidencia uma vulnerabilidade no estado atual de determinação laboratorial para essas doenças, a dependência de estrutura laboratorial e pessoal especializado. Frente a uma epidemia como a Covid-19 que exigiu um grande redirecionamento dos laboratórios públicos e privados para a detecção do SARS-CoV-2 houve, inevitavelmente, um declínio na identificação precisa de Dengue e Zika.

1.2. Diagnóstico

Como citado acima o diagnóstico preciso de doenças virais como Dengue e Zika só é possível hoje por técnicas de biologia molecular (como a RT-PCR/RT-qPCR) e por métodos sorológicos (como o teste de ELISA) que demandam equipamentos

laboratoriais e o manuseio por pessoal técnico especializado, o que encarece o diagnóstico e, principalmente, torna o processo moroso. Além disso, essa dependência de estrutura laboratorial torna o diagnóstico inviável em regiões remotas do Brasil e também em outros países tropicais afetados. Importante ressaltar que, no Brasil, o exame por RT-PCR para doenças virais é realizado apenas por laboratórios de referência da rede SUS (BRASIL, 2016), afunilando ainda mais o gargalo para a confirmação precisa por essa técnica, embora devido a pandemia da Covid-19 tenha se ampliado a rede de laboratórios autorizados a realizar tal diagnóstico.

A ampla confirmação de casos suspeitos para estas doenças é de extrema importância considerando que esta prática favorece o direcionamento das ações para as áreas apontadas como críticas, além de possibilitar a avaliação das atividades de enfrentamento desenvolvidas, o que levaria a um melhor aproveitamento dos recursos humanos e materiais disponíveis para o combate dessas epidemias.

Durante a infecção viral há uma alta presença de RNA viral no soro sanguíneo de infectados nos estágios iniciais da viremia, que acaba por decair com o tempo, e há um intervalo de aproximadamente 7 dias até o desenvolvimento de anticorpos (Figura 3) (BRASIL, 2016), logo a detecção sorológica não é possível na fase mais aguda da doença. Já a detecção molecular é mais difícil em fases mais tardias da viremia, uma vez que o material genético do vírus é menos abundante em fluídos corpóreos após 7 dias do aparecimento dos sintomas.

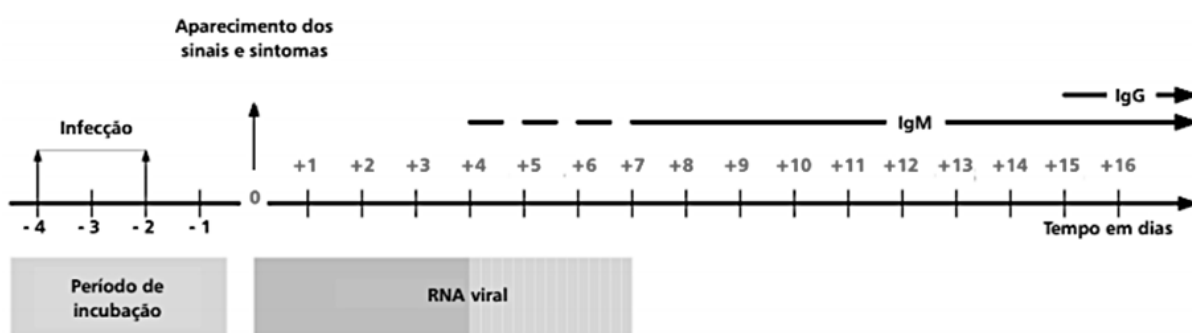


Figura 3 Janela de detecção molecular de um indivíduo infectado. São indicados os períodos ideais para detectar RNA viral e anticorpos no soro sanguíneo. Fonte: Brasil, 2016.

1.2.1. Detecção indireta por sorológica

No Brasil a principal forma de diagnóstico para essas infecções por arbovírus é por meio de testes sorológicos, através de kits comerciais de detecção rápida de anticorpos reagente do tipo IgM/IgG. No caso da dengue, a detecção de anticorpos IgM é a principal técnica de diagnóstico, seguida da detecção do antígeno NS1 nos casos graves ou de resultados anteriores incertos (BRASIL, 2016; ANDERSON et al., 2014), por exemplo, em 2020, 91,73% dos casos confirmados por exames laboratoriais relatados pelo Ministério da Saúde foram feitos por detecção de IgM (BRASIL, 2021).

Estudos avaliando a prevalência de anticorpos IgM para DENV indicam que embora os níveis desta imunoglobulina diminuam com o tempo, o período médio até um resultado IgM negativo é de 5 a 6 meses (PRINCE; MATUD, 2011). Para a duração da soropositividade IgM em infectados por ZIKV, o tempo médio para imunoglobulina M negativa é de 4 meses, mas pode permanecer por anos devido a persistência prolongada desse flavivírus (ODUYEBO et al., 2017). Já os anticorpos neutralizantes (IgG), desenvolvidos aproximadamente 2 semanas após o aparecimento de sintomas, para essas doenças provavelmente persistam por muitos anos ou até mesmo garantam uma imunidade pelo resto da vida, como é o caso relatado para Dengue (OKUNO et al. 1983), logo a diagnóstico sorológico pela detecção de anticorpos pode resultar na detecção de uma cicatriz imunológica e não de uma infecção ativa.

Mesmo sendo a aplicação mais comum no diagnóstico há uma série de limitações associadas à avaliação sorológica dessas doenças. Primeiramente, em um ensaio para detecção de anticorpos, a precisão está relacionada ao status do sistema imunológico do paciente. Pacientes imunossuprimidos, não apresentarão uma resposta imune suficiente que possa ser detectada, levando a manifestação dos sintomas por mais tempo e potencialmente a resultados falso-negativos. Outro ponto significativo é que devido a semelhança antigênica entre os flavivírus, particularmente na proteína E, reações cruzadas entre os anticorpos da classe IgM para ZIKV e DENV podem ocorrer (HALSTEAD et al., 1983; PAHO, 2015), além de que esses testes não são capazes de diferenciar os diferentes sorotipos da doença (BRASIL; 2021; PAHO, 2015). Assim se faz necessário a realização de testes complementares, como o teste de neutralização por redução de placas (PRNT), que oferecem maior grau de especificidade evitando reações cruzadas e podendo até mesmo diferenciar sorotipos

(ROEHRIG et al., 2008). Esta necessidade além de atrasar o diagnóstico adiando a tomada de medidas de contenção e prevenção das autoridades de saúde acarreta em uma outra limitação: o PRNT diferentemente dos testes ELISA que tem uma execução simples e corriqueira em laboratórios clínicos e de saúde pública, é moroso e apresenta baixo rendimento e tempo de resposta longo para resultados (podendo chegar a 7 dias) (LANCIOTTI et al., 2008; ROEHRIG et al., 2008), sendo utilizado basicamente em estudos de vacinas e na pesquisa (ROEHRIG et al., 2008).

1.2.2. Detecção direta

A detecção direta se refere às metodologias de isolamento viral e as técnicas para detecção de ácidos nucleicos. A detecção do material genético pode ser dividida em três etapas principais: o isolamento do genoma, a sua amplificação e, por fim, a detecção. O diagnóstico nucleico é a evidência definitiva e mais precisa na identificação do agente de uma infecção viral, uma vez que identifica o agente causador da doença por meio de sequências específicas em seu código genético podendo assim apenas detectar uma infecção ativa e não uma cicatriz imunológica, sendo considerada a metodologia de detecção padrão-ouro. Por outro lado, há uma desvantagem em relação à detecção sorológica, uma curta janela de detecção. Estudos iniciais indicam uma janela de detecção nucleica média até o sétimo/oitavo dia após o aparecimento dos sintomas para ZIKV e DENV para amostras do soro sanguíneo (ODUYEBO et al., 2017; SALLES et al., 2018). Embora o tempo médio de detecção seja baixo, este período se trata da fase mais aguda para essas doenças, uma vez que há no sangue do indivíduo infectado uma grande quantidade de vírus que leva ao acometimento de diversas regiões do corpo causando os sintomas. Além, vírus circulante pode ser captado por mosquitos durante a hematofagia e acabar sendo transmitido para mais pessoas.

Mesmo com uma janela de detecção molecular média curta existem relatos de indivíduos em que foi possível detectar o RNA viral para essas doenças em fluidos corporais por períodos maiores. Em um estudo sobre persistência de ZIKV, Paz-Bailey e colaboradores (2018) relataram o período até a eliminação do RNA do vírus em diferentes fluidos corpóreos: no soro sanguíneo o tempo médio foi de 14 dias (intervalo de confiança de 95%, variando de 11 a 17 dias) e o percentil 95 foi de 54 dias (intervalo de confiança de 95%, variando de 43 a 64 dias); na urina, 8 dias para média (intervalo

de confiança de 95%, variando de 6 a 10 dias) e 39 dias para o percentil 95 (intervalo de confiança de 95%, variando de 31 a 47 dias); e 34 dias intervalo de confiança de 95%, variando de 28 a 41 dias) e 81 dias (intervalo de confiança de 95%, variando de 64 a 98 dias) no sêmen para a média e o percentil 95 respectivamente.

Para Dengue, alguns casos específicos foram relatados observando uma persistência do RNA viral no sêmen (LALLE et al., 2018) e em secreção vaginal (IANNETTA et al., 2017) por 37 e 18 dias, respectivamente, após o início dos sintomas quando investigado a possibilidade de transmissão sexual deste vírus. No entanto, esta possibilidade de transmissão foi descartada posteriormente (MOLTON et al., 2018). Estudos mais recentes apontam que, de modo geral, o tempo médio de detecção do RNA viral do DENV no soro sanguíneo alcança 14 dias após o aparecimento dos sintomas (KORHONEN et al., 2014). Estes exemplos de detecção prolongada do material genético viral podem indicar uma janela de transmissão mais extensa em alguns infectados.

Duas técnicas recentemente desenvolvidas na tentativa de avançar o diagnóstico por meio da detecção molecular de RNA podem ser citadas: SHERLOCK e *Toehold switch*. A técnica SHERLOCK (*specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking*) faz uso da atividade ribonuclease guiada por RNA da Cas13a (Figura 4). A enzima Cas ativada pelo RNA alvo passa a exibir atividade nuclease contra qualquer RNA presente na reação *in vitro*. Na reação são adicionados um RNA repórter fusionado a um fluoróforo e um supressor de fluorescência, cada um em uma extremidade da fita de RNA. A Cas13a ativa degrada o RNA repórter, fazendo com que o fluoróforo seja liberado e passe a emitir fluorescência (GOOTENBERG et al., 2017, 2018).

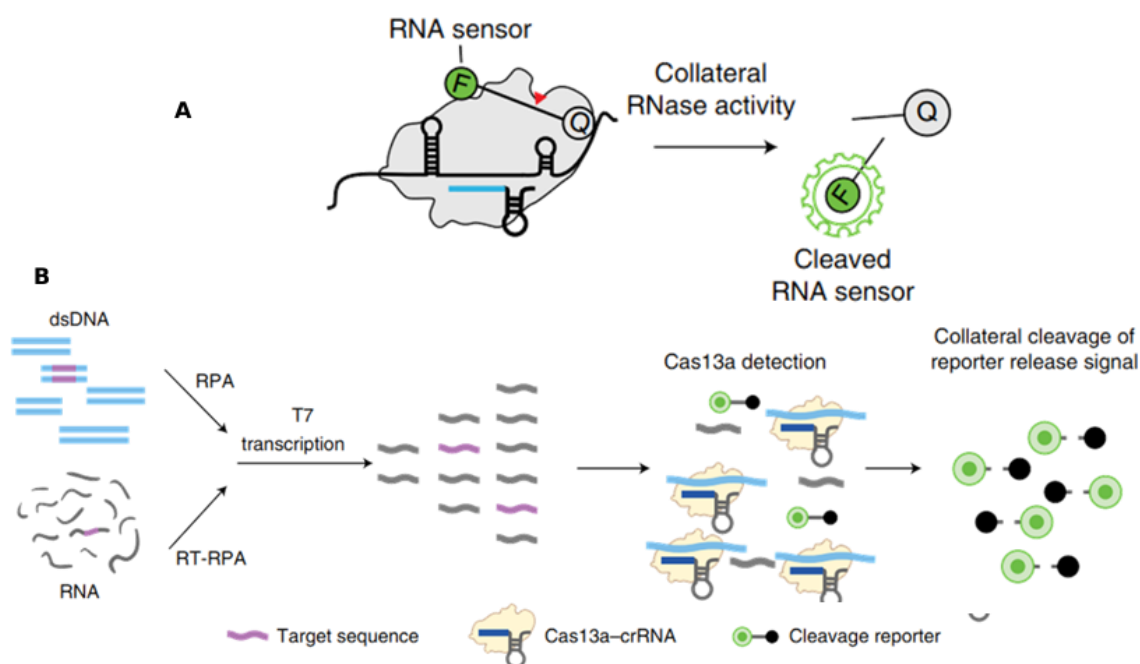


Figura 4 Esquema do funcionamento da detecção SHERLOCK. A, representação da liberação do fluoróforo repórter via atividade ribonuclease colateral da CRISPR-Cas13. O complexo CRISPR-Cas13-RNA é ativado pela ligação a um RNA alvo complementar, a ativação desencadeia o corte colateral de um RNA repórter inespecífico marcado com fluoróforo (F) e um supressor (Q) quando intacto há a supressão da fluorescência e quando clivado pelo complexo CRISPR-Cas13 ativo há a emissão de fluorescência. B, esquema das etapas do ensaio SHERLOCK, começando com a pré-amplificação de um molde de DNA ou RNA alvo. Os alvos amplificados são convertidos em RNA por meio da transcrição T7 e, em seguida, detectados por complexos Cas13-crRNA, que ativam e clivam repórteres de RNA fluorescentes. Fonte: Gootenberg et al., 2017.

Esta técnica emprega, na tentativa de simplificar o processo, um método isotérmico para amplificação de ácidos nucleicos como alternativa à PCR e a RT-PCR convencionais. Esta amplificação isotérmica é realizada por meio de transcrição reversa seguida de amplificação da polimerase recombinase (RT-RPA), neste método a amplificação é feita a uma temperatura constante sem a necessidade de um termociclador, tornando a reação mais barata. No entanto, este sistema emprega um conjunto enzimático complexo que, conseqüentemente, acarreta também em um maior tempo total do ensaio. A detecção na técnica SHERLOCK requer um total de 6 enzimas: a transcriptase reversa, o conjunto de enzimas para RPA (proteínas envolvidas no deslocamento da dupla fita, a polimerase e recombinases), a RNA T7 polimerase para transcrição do c-DNA gerado e a ribonuclease Cas13a responsável pela detecção em si. O conjunto enzimático, juntamente com a necessidade da construção de um RNA repórter fluorescente sintético, adiciona complexidade significativa ao método.

Já a tecnologia do *Toehold switch* é baseada em um RNA regulatório localizado na extremidade 5'-UTR do mRNA, este aptâmero atua sequestrando o sítio de ligação ao ribossomo (RBS) e o códon inicial (AUG) do gene a jusante. A estrutura secundária que captura o RBS só é liberada pelo pareamento de bases com o RNA alvo na porção do sítio de ancoragem (*Toehold*). Para fim diagnóstico, o *switch* é construído tendo como alvo o RNA viral. A expressão do gene sob controle do *Toehold switch* resulta na resposta ao teste diagnóstico. O teste é realizado em reação de expressão gênica *in vitro* (GREEN et al., 2014; PARDEE et al., 2014).

Os dois métodos já foram empregados para detecção dos vírus da Zika e da Dengue (PARDEE et al., 2016; MYHRVOLD et al., 2018). Entretanto, os processos completos de diagnóstico demonstrados nesses estudos apresentam etapas desvantajosas dos pontos de vista da execução e do custo. O diagnóstico usando SHERLOCK exige o emprego de equipamento fluorímetro para determinação do resultado. Além disso, tanto o SHERLOCK quanto o processo publicado com o *Toehold switch*, empregam uma etapa preliminar de amplificação do RNA viral por meio de RT-PCR ou RT-RPA e subsequente transcrição do cDNA gerado. Estas etapas fazem-se necessárias para que se possa aumentar a “carga viral” a ser empregada no teste resultando numa maior resposta no teste, uma vez que se amplificou o número de sequências alvo presentes na amostra. As doses virais em fluidos de fontes não invasivas (como urina, saliva e soro sanguíneo) são baixas, na escala de femtomol (fM), exigindo uma sensibilidade muito alta para a detecção via um circuito direto. Por exemplo, a dose viral de ZIKV documentada na urina é de 202×10^6 cópias/ml (365 fM) (GOURINAT et al., 2015), para a saliva é reportada uma dose de 3×10^6 cópias /ml (4.9 fM) (BARZON et al., 2016) e no soro sanguíneo os números são ainda menores 7.2×10^5 cópias /ml (1.2 fM) (LANCIOTTI et al., 2008).

Com esses requisitos, os dois métodos só podem ser desenvolvidos em um laboratório bem equipado e por pessoal especializado. Para tentar contornar esse problema, esse trabalho desenvolve estratégias de sistemas de amplificação de sinal objetivando suprimir a necessidade das etapas preliminares de amplificação do RNA viral, por RT-PCR ou RT-RPA, e transcrição. Para isso, tomou-se como base para o desenvolvimento do dispositivo genético o sistema de *Toehold switch*, uma vez que este permite certa flexibilidade na escolha do gene repórter empregado como resposta ao teste.

1.3. Toehold switch

Riboreguladores que ativam a expressão gênica devem ser capazes de alternar entre duas estruturas secundárias, uma que previna (estado *off*) e outra que promova a tradução (estado *on*), a partir da ligação de um RNA cognato transativador. *Toehold switches* são RNAs regulatórios projetados com base em estudos que descrevem a influência de estruturas secundárias na tradução do mRNA e conhecimento de termodinâmica e cinética de RNAs para cumprir essa função.

Neste tipo de riboregulador o aptâmero é projetado para promover um deslocamento da fita a partir de um ponto de ancoragem linear (*toehold*). As interações entre as espécies reativas são controladas cineticamente por *hairpins* ou complexos multifitas que possuem domínios de fita simples expostos, como o ponto de ancoragem. Um sistema de *Toehold switch* é composto por duas fitas de RNA, denominadas *switch* (interruptor) e *trigger* (gatilho) (Figura 5). O RNA *switch* contém a sequência codificadora do gene a ser regulado. Na extremidade 5'-UTR do RNA mensageiro é inserido o *switch*, um módulo capaz de formar um *hairpin* que sequestra um sítio de ligação do ribossomo (RBS) e o códon inicial. Este último é seguido de uma sequência conectora (*linker*) de 21 nucleotídeos (nt) que codifica aminoácidos de baixa massa molar fusionados à sequência N-terminal do gene repórter. O RNA *switch* também contém a sequência de ancoragem que servirá de sítio para pareamento inicial do RNA *trigger* (GREEN et al., 2014).

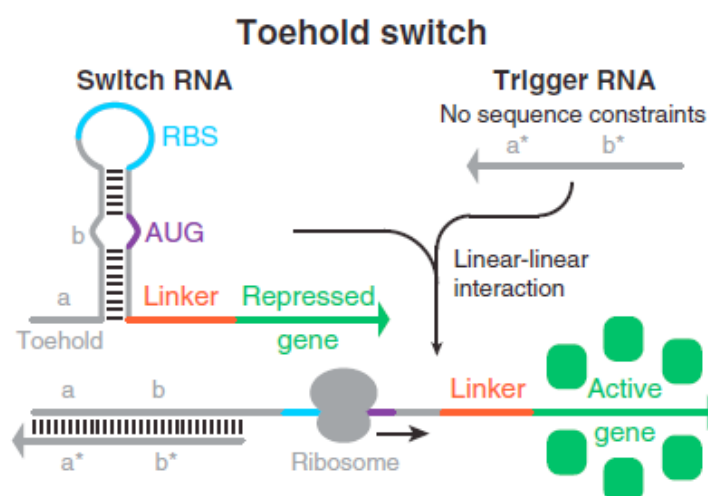


Figura 5 Esquema ilustrando o funcionamento do Riboregulador. O RNA *switch* mantém a transcrição do gene repórter reprimida até que o RNA *trigger* seja adicionado à reação. O RNA *trigger* pareia com o RNA *switch* a partir da sequência de ancoragem (*toehold*) desestruturando o *hairpin* e liberando tanto o sítio de ligação do ribossomo (RBS) quanto o

códon inicial do gene repórter. Desta forma, a tradução é ativada. As sequências variáveis são mostradas em cinza. Fonte: Green et al. 2014.

O RNA *trigger*, por sua vez, é uma sequência de RNA fita simples capaz de se ligar ao RNA *switch*, desestruturar o *hairpin*, e expor as sequências do RBS e do códon inicial para que a transcrição do gene repórter seja ativada (GREEN et al., 2014). Assim, o funcionamento do sistema fica dependente da presença do RNA *trigger*. No estado *off*, ou seja, na ausência do RNA *trigger*, o *hairpin* do riboregulador impede a tradução do gene repórter através do sequestro do RBS e do códon inicial. Já no estado *on*, iniciado pela interação do RNA gatilho no sítio de ancoragem, há a desestruturação do *hairpin*, que libera o RBS e o códon AUG e leva a expressão do gene anteriormente reprimido.

Essa metodologia apresenta um alto nível de ortogonalidade, com relatos descrevendo uma amplitude dinâmica média entre os estados *on/off* de mais 400 vezes *in vivo* (GREEN et al., 2014) e uma amplitude de ativação de 10 a 140 vezes em ensaios *in vitro* (PARDEE et al., 2014).

Pardee e colaboradores (2016) classificaram os *toehold switches* em dois conjuntos denominados série A e série B. Os riboreguladores da série A são aqueles similares ao descrito por Green e colaboradores (2004), apresentando um *loop* e uma haste do *hairpin* com 11 e 18 nt, respectivamente. O riboreguladores da série B têm um *design* caracterizado por apresentar um *loop* de 12 nt e uma haste do *hairpin* mais termodinamicamente estável, devido à inserção de um domínio rico em citosina e guanina no topo da haste antes da abertura do *loop*, com o objetivo de diminuir a expressão do gene regulado no estado *off* do dispositivo. (PARDEE et al., 2016)

Em comparação com *switches* convencionais, os *toehold switches* possibilitam o desenvolvimento de dispositivos com grande número de potenciais sequências alvo (RNA *trigger*), uma vez que o riboregulador apresenta um sítio de ancoragem, anterior ao *hairpin*, que inicia o pareamento entre as moléculas de RNA, e por sequestrarem a região em torno do códon inicial, mas deixando o RBS e o códon de início desemparelhados no *hairpin*. Dessa forma, a sequência alvo não fica limitada a conter a sequência desses elementos necessários para a tradução (GREEN et al., 2014). Assim, *toehold switches* garantem uma maior programabilidade e alternativa de alvos que *switches* convencionais.

1.4. Integrases sítio-específicas

Um dos sistemas de amplificação avaliados neste trabalho é baseado na atividade de uma integrase sítio-específica de serina. Integrases sítio-específicas podem ser classificadas em duas subfamílias distintas: as recombinases sítio-específicas de serina e as recombinases sítio-específicas de tirosina (ROSS; LANDY, 1982; RUTHERFORD; VAN DUYNE, 2014). As integrases catalisam a integração e a excisão dos bacteriófagos no genoma bacteriano durante os ciclos lisogênico e lítico. Esta recombinação ocorre por meio de sítios específicos de aproximadamente 50 pb denominados *attB* (sítio de ligação da bactéria) e *attP* (sítio de ligação do fago), após a recombinação destes resulta na formação de dois outros sítios referidos como *attL* (sítio de ligação esquerdo) e *attR* (sítio de ligação direito) (OLORUNNIJI et al., 2016). A orientação dos sítios de recombinação conduz a atividade realizada pela integrase (Figura 6), podendo estas realizarem a inversão, integração ou excisão de porções de DNA, dependendo da posição destes sítios.

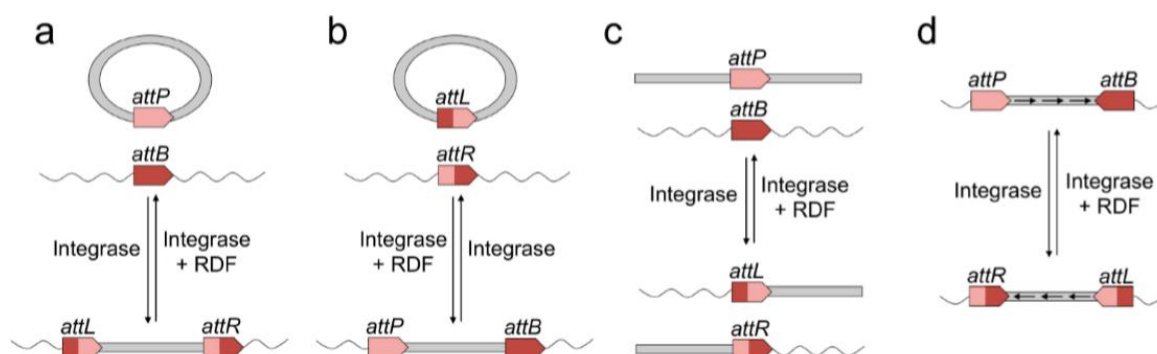


Figura 6 Representação da ação de uma integrase do tipo serina. Em vermelho apresenta-se o sítio de reconhecimento inicial *attB* e em rosa o sítio inicial *attP*, após recombinação observa-se os sítios resultantes (vermelho e rosa) *attR* e *attL*. Em (a) e (b) observa-se a integração de DNA, em (c) representa-se a excisão de sequências nucleicas e em (d) a inversão de fragmento de DNA. Fonte: Merrick et al., 2018.

As integrases do tipo tirosina necessitam de um fator de integração e proteínas acessórias para a realização da excisão e a integração dos fragmentos de DNA, a recombinação ocorre por meio de cortes nas fitas simples do DNA, levando à formação de ligações covalentes 3'-fosfotirosina e posterior recombinação entre os sítios de reconhecimento (ROSS; LANDY, 1982). Já as integrases do tipo serina não necessitam de componentes acessórios, além dos sítios de reconhecimento *attB* e *attP*, fazendo com que essa classe de recombinases seja altamente direcional quando aplicada sozinha. A recombinação só pode ser revertida na presença da proteína

acessória RDF (do inglês, *recombination directionality factor*). Nesta classe de integrases os sítios de reconhecimento *attB* e *attP*, assim como os sítios resultantes da recombinação *attL* e *attR*, possuem sequências distintas um dos outros (MERRIC et al., 2018), garantindo a unidirecionalidade do processo por meio do estabelecimento da orientação dos sítios *attB* e *attP* no desenho da construção.

Este trabalho utiliza integrases de modo a aproveitar a atividade de inversão destas enzimas. Neste processo (demonstrado na figura 7D), a recombinação se dá por meio de rearranjos espaciais dos dímeros integrases a partir da ligação da enzima nos sítios de reconhecimento. Inicialmente há a quebra na dupla fita, que ocorre no centro da sequência *attP* e *attB*, devido a ligação covalentemente na extremidade 5' da fita de DNA que resulta em ligações covalentes 5'-fosfoserina com as extremidades antes da religião destas. Em seguida, as duas subunidades da enzima rotacionam entre si, uma das subunidades está ligada ao sítio *attP* e a outra ao sítio *attB*, ocasionando a inversão do fragmento de DNA entre os sítios de reconhecimento e gerando dois os dois novos sítios *attL* e *attR* após a religação do DNA (MERRIC et al., 2018). Portanto, as integrases do tipo serina são capazes de realizar a inversão de um segmento de DNA de forma unidirecional e irreversível (na ausência do cofator RDF), gerando uma memória permanente, sem que seja necessário gasto de energia ou adição componentes adicionais para o funcionamento.

1.5. Protease Mf-Lon

A Mf-Lon é uma protease Lon altamente específica originária de *Mesoplasma florum*, que degrada proteínas fusionadas a uma cauda de degradação específica (pdt, do inglês *protein degradation tag*) (GUR; SAUER, 2008), neste trabalho utilizou-se uma variação da *tag* *ssrA* desta Lon protease, a cauda pdt#5 de 27 aminoácidos (AANKNEENTNEVPTFMLNAGQANRARQ), desenvolvida por Cameron e Collins (2014). No estudo de Cameron e Collins (2014) caracterizou-se a protease Mf-Lon frente a sua cauda de degradação selvagem e a mesma com diferentes alterações, foi observado uma queda de 50% na fluorescência da GFP fusionada a cauda pdt #5 após 1,5 horas da indução da expressão da protease *in vivo*, reduzindo a fluorescência em 70% e 90% com 2 e 3 horas, respectivamente, após a indução (Figura 7).

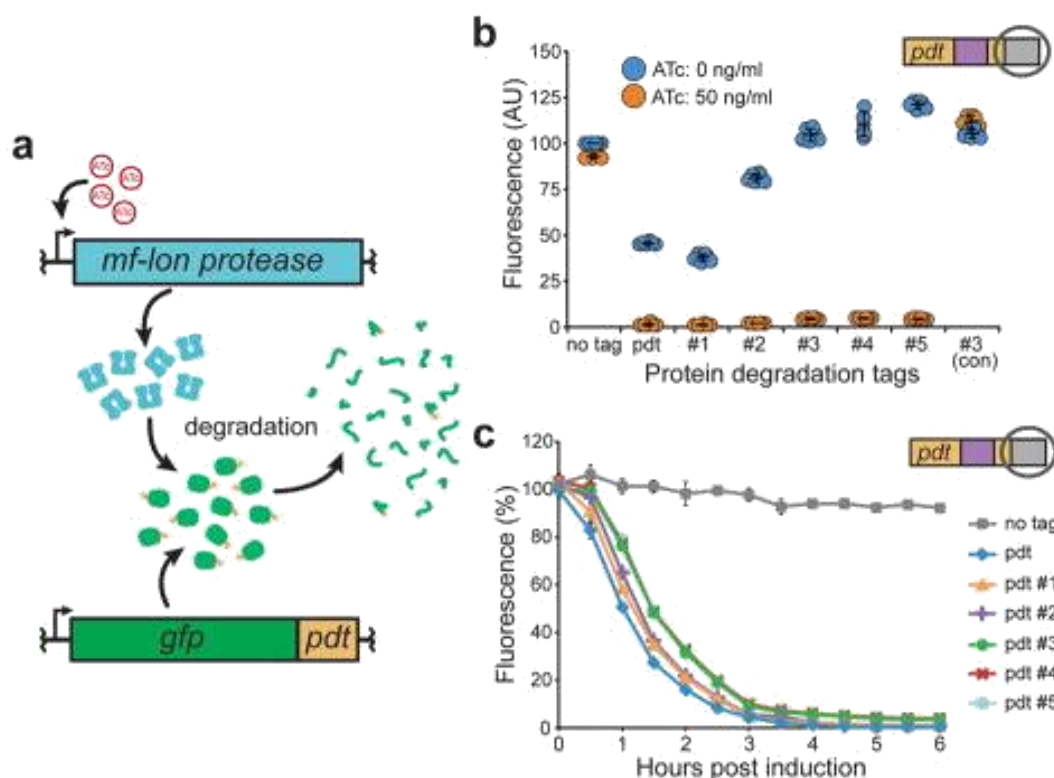


Figura 7 Caracterização da atividade da protease Mf-Lon *in vivo* frente a diferentes caudas de degradação. (a) Representação do funcionamento do dispositivo, a protease tem sua expressão induzida por anidrotetraciclina (ATc) e a GFP é expressa continuamente. (b) Fluorescência medida por citometria de fluxo 6 horas após a indução, valores da média de seis repetições biológicas. A cauda pdt#5 tem a menor influência na fluorescência inicial da proteína repórter. (c) Medições de citometria de fluxo da degradação de GFP após indução da Mf-Lon com 50 ng/ml ATc. Fluorescência reduzida em 90% após 3 horas da indução, alcançando quase 100% de degradação após 4 horas para todas as caudas de degradação avaliadas. Fonte: Cameron; Collins, 2014.

1.6. Desafios científicos e tecnológicos

Os dispositivos de RNA regulatório, denominados *Toehold switches*, foram construídos anteriormente pelo grupo de pesquisa SynBio Unesp AQA para identificação dos vírus da Dengue (ZOCCA, 2018; bolsa Fapesp 2016/02516-2) e da Zika (PAIVA, 2018; bolsa Fapesp 2016/02520-0). Tais ribossensores apresentaram especificidade suficiente para distinguir RNAs de um e do outro vírus com especificidade na casa do nanomolar (nM). O sistema de expressão gênica *in vitro* já usado para testar os *switches* construídos é composto pelos componentes comumente encontrados em kits comerciais de transcrição e tradução extraídos de *E. coli*: RNA polimerase, ribossomo, nucleotídeos, t-RNAs, aminoácidos, aminoacil-transferases. O DNA molde usado para a reação é um plasmídeo composto por um

gene repórter sob controle de um promotor forte e de um RNA regulatório (riboregulador) do tipo *Toehold Switch*, capaz de detectar a presença do RNA viral.

No sistema direto, em que o *Toehold switch* controla diretamente a síntese da proteína repórter, a reação inicia com alta proporção RNA viral (*trigger*)/mRNA (*switch*). Porém, ao longo do tempo, a concentração de mRNA aumenta até que, em determinado momento, supera a concentração de RNA viral. Assim, o tempo de desenvolvimento da reação fica limitado à concentração inicial de RNA viral. Neste trabalho, foram construídas variações deste sistema para que a ativação da expressão gênica ocorra por uma cascata de regulação em que a síntese de uma proteína seja condicionada à presença do RNA viral, por sua vez a presença desta proteína na reação acarretará na expressão do gene repórter. Empregando assim os *Toehold switches* previamente desenvolvidos (ZOCCA, 2018; PAIVA, 2018) em diferentes alternativas de sistemas de amplificação de sinal, tornando a detecção do RNA viral mais sensível.

Os riborreguladores DENV10550(2) e ZIKV1440(2.6), apresentados na tabela 3, foram selecionados para serem empregados nos sistemas de amplificação de sinal. A nomeação destes dispositivos se baseia na região em que o RNA *trigger* específico ao *switch* está no genoma viral.

Tabela 3 Sequência dos riborreguladores empregados. São destacados o RBS (azul), o códon inicial (verde) e a sequência do *linker* (roxo). Fonte: O próprio autor.

Switch	Sequência
ZIKV1440 (2.6)	5'TTTCGCTCTATTCTCATCAGTTTCATGTCCTGTGTCGGTCTTTAGAACAGAG GAGATAAAGATGGACACAGGACACAAGCTCGAGGCAGCGCAAAAG
DENV10550 (2)	5'TCCTCTAACCGCTAGTCTGCTACCCCATGCGTACAGCTTGTTATAGTTATGA ACAGAGGAGACATAATATGACTAAGCTGTACGCAGTCGACTCGACGGCAGC GCAAAAG

Assim, temos que o *trigger* DENV10550 se trata de uma sequência conservada entre os diferentes sorotipos de Dengue (Figura 8) e localizada na porção 3' UTR aproximadamente entre os nucleotídeos 10486 e 10524 do genoma, esta mesma sequência não é encontrada no material genético das linhagens de ZIKV. Já o *trigger* ZIKV1440 é assim nomeado por ser referente a uma sequência altamente conservada presente na sequência da proteína estrutural E (Figura 9) entre os nucleotídeos 1436 e 1478 do genoma de ZIKV da linhagem asiática, sendo que a sequência deste RNA *trigger* não é encontrada no material genético dos vírus da Dengue.

Sequence ID	Start	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	39	End	Organism																		
Query_8541	(+)1	A	A	G	C	T	G	T	A	C	G	C	A	T	G	G	G	T	A	G	C	A	G	A	C	T	A	G	C	G	G	T	T	A	G	A	G	G	A	39	trigger DENV10550	
NC_001477	(+)10,486	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10,524	Denque virus 1
NC_001474	(+)10,472	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10,510	Denque virus 2
NC_001475	(+)10,459	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10,497	Denque virus 3
NC_002640	(+)10,395	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10,433	Denque virus 4

Figura 8 Alinhamento de múltiplas seqüências comparando a seqüência do RNA *trigger* DENV10550 com os genomas referência (RefSeq) dos 4 sorotipos virais da Dengue usando a plataforma NCBI *Multiple Sequence Alignment Viewer*. Nucleotídeos destacados em vermelho diferem da seqüência do *trigger*. Fonte: O próprio autor.

Sequence ID	Start	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	43	End	Organism																				
consensus	(+)1	T	A	A	T	G	A	C	A	C	A	G	G	A	C	A	T	G	A	A	A	C	T	G	A	T	G	A	G	A	A	T	A	G	A	G	C	G	A	A	R	G	T	T	43	
Query 47129	(+)1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43	trigger ZIKV1440	
NC_035889.1	(+)1,436	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,478	Zika virus	

Figura 9 Alinhamento comparando a seqüência do RNA *trigger* ZIKV1440 com o genoma referência (RefSeq) da linhagem asiática do ZIKV usando a plataforma NCBI *Multiple Sequence Alignment Viewer*. Nucleotídeos destacados em vermelho diferem da seqüência do *trigger*. Fonte: O próprio autor.

Nos testes de funcionalidade para o riboregulador DENV10550Switch(2) controlando diretamente a expressão de uma luciferase e utilizando-se sequências sintéticas como RNA *trigger*, a amplitude de sinal máxima foi gerada utilizando 5 ng do plasmídeo e aplicando-se 500 ng do RNA *trigger* DENV10550 (específico), atingindo uma amplitude 11,43 vezes superior à amplitude de resposta com 500 ng do *trigger* inespecífico (Figura 10). Pode-se averiguar também pela figura 8 que o aumento de sinal não parece ser proporcional ao aumento de RNA *trigger* na reação, uma vez que aplicando 5 ng do plasmídeo e 600 ng do RNA *trigger* específico resultou em uma amplitude de sinal 7,5 vezes maior que com 600 ng de RNA *trigger* inespecífico, inferior ao alcançado com 500 ng de RNA gatilho (ZOCCA, 2018).

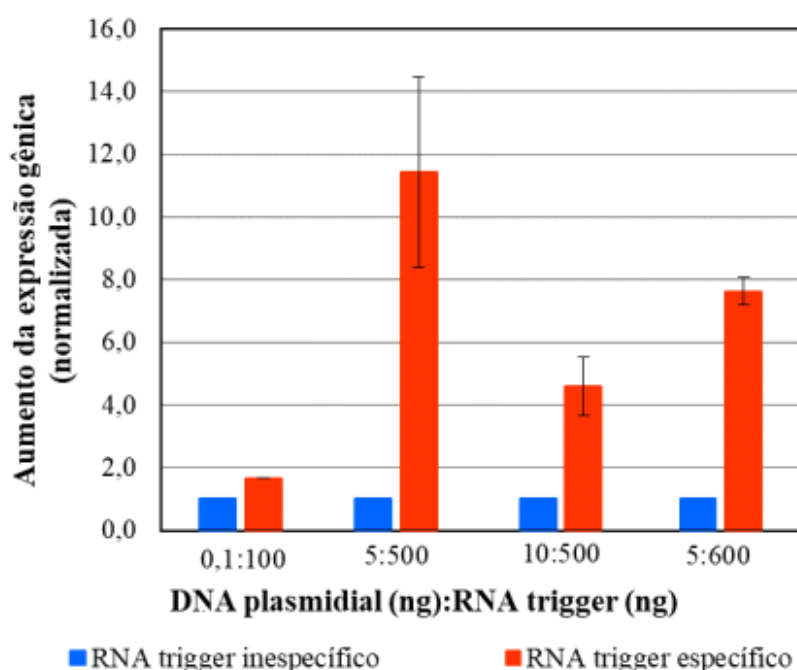


Figura 10 Amplitude de ativação do *switch* DENV10550(2). Reações, incubadas durante 10 minutos, foram realizadas variando a quantidade de plasmídeo pT7luc_DENV10550Switch(2)_linker (0,1 ng, 5 ng e 10 ng) e variando a quantidade de RNA *trigger* (específico, DENV10550, e inespecífico, ZIKV1440) adicionado (100 ng, 500 ng e 600 ng). Fonte: Zocca, 2018.

Já a funcionalidade do riboregulador ZIKV1440(2.6), avaliada por reações de transcrição e tradução *in vitro* em que o *switch* controlava diretamente a expressão de uma luciferase e também se utilizou sequências sintéticas de RNA como RNA *trigger*, notou-se uma amplitude máxima de ativação 2,89 vezes maior na presença de 700 ng do RNA *trigger* específico (ZIKV1440) em relação a ativação com 700 ng do RNA *trigger* inespecífico (DENV10550) (Figura 11) (PAIVA, 2018)

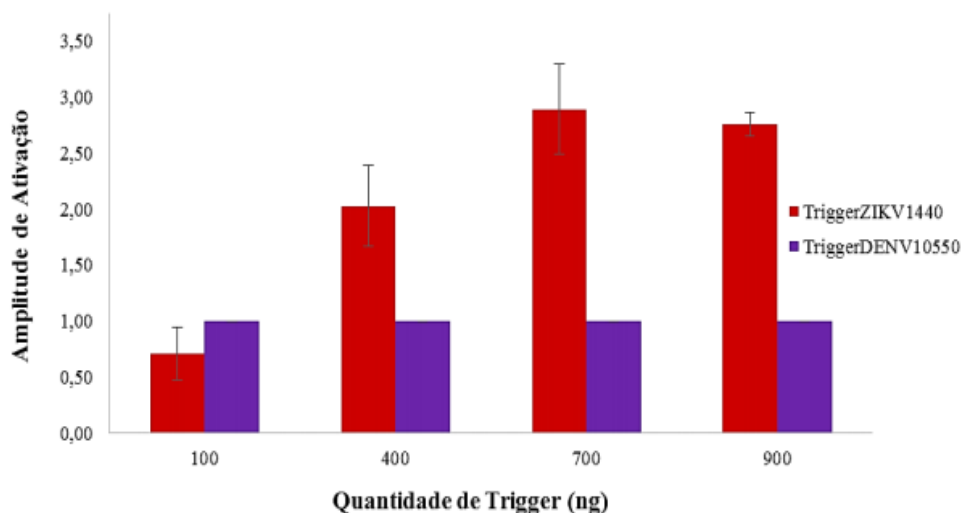


Figura 11 Amplitude de ativação do *switch* ZIKV1440(2.6). As reações foram realizadas fixando a quantidade do plasmídeo pT7luc(GCA)-ZIKV1440- Switch2.6-linker em 10 ng e variando a quantidade de RNA *trigger* (100 ng, 400 ng, 700 ng e 900 ng). Fonte: Paiva, 2018

Estes resultados evidenciam a funcionalidade dos riboreguladores desenvolvidos, mas também mostram a necessidade de implementação de um método para amplificação do sinal.

2. Objetivo

Desenvolvimento de um sistema de amplificação de sinal para detecção de RNA viral por meio da utilização de riboreguladores sensíveis a sequências específicas do genoma viral de ZIKV e DENV, sendo estes responsáveis pela regulação da expressão de um gene ou de cascata de genes que produzem a resposta.

2.1. Objetivos específicos

- Construir os circuitos de sinalização baseados:
 - na T7 RNA polimerase
 - na protease *mf*-Lon
 - em integrases do tipo serina
- Avaliar a funcionalidade dos circuitos quanto a sensibilidade e especificidade em relação ao RNA viral alvo.

3. Material e Métodos

O desenvolvimento desse projeto empregou técnicas-padrão de biologia molecular para procedimentos como: reação em cadeia da polimerase (PCR), clonagem gênica e transformação de bactérias por choque térmico. Empregou também técnicas-padrão de bioquímica como: determinação luminescência e de fluorescência.

3.1. Linhagens celulares

Para a propagação de plasmídeos e expressão proteica utilizou-se a linhagem *E. coli* Top10. No entanto para a produção da proteína fluorescente verde (sob controle do promotor T7) fusionada à cauda de degradação pdt#5, empregou-se a linhagem *E. coli* BL21, esta linhagem expressa a T7 RNA polimerase quando induzida com IPTG (isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo).

3.2. Meio de cultura

3.2.1. Meio Luria-Bertani

Os cultivos de bactérias foram realizados em meio de cultura Luria-Bertani (LB) com os antibióticos nas concentrações como descrito nas próximas etapas.

Para o preparo de 1L deste meio de cultura incluiu-se 10 g de triptona ou peptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl. Estes foram dissolvidos em água destilada com ajuda de um agitador magnético. Em seguida, o pH foi ajustado para 7,0 – 7,2 e o volume completado para 1 L com água destilada. Já para a preparação de meio LB sólido acrescentou-se 15 g de ágar (15 g/L) à solução anterior, sendo os meios devidamente autoclavados posteriormente a preparação.

3.2.2. Meio SOC

O meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) foi utilizado para no pré-cultivo das células competentes transformadas antes do plaqueamento destas em placas de petri contendo LB ágar. Para preparação de 1 L deste meio foram adicionados 5 g de extrato de levedura, 20 g de triptona, 0,584 g de NaCl, 0,186 g de KCl e 2,4 g de MgSO₄. Após solubilizados em água destilada, o pH foi ajustado para 7,5 e o meio seguiu para autoclavagem. Com o meio estéril, adicionou-se 20 mL de uma solução de glicose 20% autoclavada separadamente.

3.3. Soluções

- Ampicilina

Solução estoque preparada na concentração de 100 mg/mL e utilizada a 100 µg/mL em soluções finais. O antibiótico foi dissolvido em água deionizada e esterilizado por filtração com filtro de poro 0,22 µm para seringa descartável de 5 mL, as soluções estoque foram aliquotadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -20 °C.

- Cloranfenicol

Solução estoque preparada na concentração de 25 mg/mL, 1000 vezes mais concentrada que a concentração empregada no uso de 25 µg/mL. O antibiótico foi dissolvido em etanol absoluto, aliquotado em microtubos de 1,5 mL e armazenado em freezer a -20 °C.

- Canamicina

Solução estoque preparada na concentração de 50 µg/mL, concentração de uso de 50 µg/mL. O antibiótico foi dissolvido em água deionizada e esterilizado por filtração com filtro de poro 0,22 µm, sendo posteriormente aliquotado em microtubos de 1,5 mL e armazenado em freezer a -20 °C.

- Tampão Tris-acetato EDTA (TAE)

Para 1 litro do tampão estoque 50X, adicionou-se 242 g de Tris-base em aproximadamente 600 mL de água deionizada (dissolvido com ajuda de um agitador magnético), 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 mL da solução de EDTA 0,5 M (pH 8,0) e completando-se o volume para 1 litro com água deionizada.

Para a solução de uso 1X, diluiu-se 20 mL de TAE 50X em um volume final de 1 L de água deionizada.

- Tampão de corrida Tris-Glicina do SDS-PAGE

Para 1 litro do tampão de corrida, adicionou-se 16,7 g de Tris-base (250 mM) em aproximadamente 700 mL de água deionizada (dissolvido com ajuda de um agitador magnético), 104,5 g de glicina (2,5 M) e SDS 0,5% (m/v).

- Tampão de amostra 2x (tampão Laemmli)

A solução do tampão de amostra 2x foi feita contendo 10 % β -mercapto, 20 % (m/v) de glicerol, 4 % (m/v) de SDS, 100 mM de Tris-HCL (pH 6,8) e 0,2% de azul de bromofenol. Para uso adicionou-se uma parte de tampão para uma parte de amostra.

- Gel de separação 12 % (2 géis) de SDS-PAGE

Acrilamida: Bis-acrilamida (30%, 29:1)	4,2 mL
Tris-HCL 1,5 M (pH 8,8)	2,5 mL
Água destilada	2,3 mL
SDS 10% (m/v)	1 mL
Persulfato de amônio 10% (m/v)	50 μ L
TEMED	10 μ L

- Gel de resolução 5,5 % (2 géis) de SDS-PAGE

Acrilamida: Bis-acrilamida (30%, 29:1)	0,8 mL
Tris-HCL 1 M (pH 6,8)	0,8 mL
Água destilada	4,1 mL
SDS 10% (m/v)	0,7 mL
Persulfato de amônio 10% (m/v)	65 μ L
TEMED	15 μ L

- Solução fixadora do SDS-PAGE

Ácido acético glacial	100 mL
Etanol absoluto	400 mL
Água destilada	500 mL

- Solução reveladora (Comassie Blue) do SDS-PAGE

Comassie Brilliant Blue R-250 (5%)	10 mL
Metanol (100%)	125 mL
Ácido fosfórico	6 mL
Sulfato de amônio	50 g

Completar para 500 mL com água destilada.

- Solução de rNTPS

Solução preparada em água livre de nucleases adicionando-se volumes iguais de cada rNTPS (rGTP, rCTP, rATP e rUTP) com concentrações individuais de 100 mM, resultando em uma solução de rNTPS a 25 mM, dilui-se esta solução em 10x para adquirir o mix de rNTPs a 2,5 mM utilizado na transcrição *in vitro* dos RNA *trigger*.

3.4. Plasmídeos e oligonucleotídeos

O vetor pSB1C3 (<http://parts.igem.org/Part:pSB1C3>) (Figura 12) foi utilizado como base para a construção de todos os dispositivos empregados nas diferentes estratégias de amplificação de sinal. Este plasmídeo possui 2070 pares de bases de comprimento, as sequências do *BioBrick* prefixo e *BioBrick* sufixo, sítio *ori* de replicação pMB1 (número de cópias na célula de 100-300) e o gene *CmR*, que codifica a proteína de resistência a cloranfenicol.

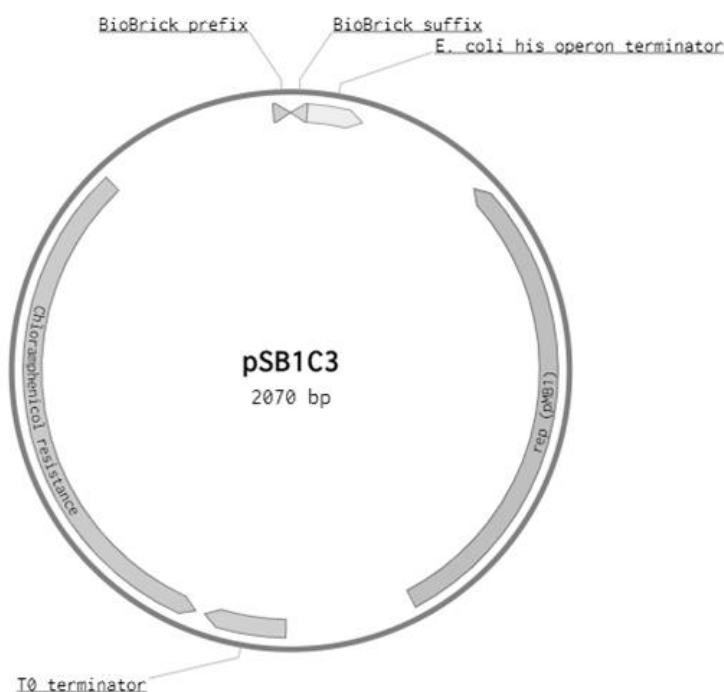


Figura 12 Esquema ilustrativo do plasmídeo pSB1C3. São indicados no mapa do plasmídeo as sequências do *BioBrick* prefixo e sufixo, do terminador do operon his de *E. coli*, do sítio de replicação pMB1, do terminador T0 e do gene de resistência a cloranfenicol. Fonte: O próprio autor, imagem gerada utilizando o software Benchling.

O vetor pT7luc(GCA)-ZIKV1440-Switch.2.6_linker de 4416 pb (Figura 13), desenvolvido por Paiva (2018), contém a sequência do *switch* ZIKV1440(2.6) e o gene da luciferase de vagalume, com ATG substituído por GCA para fusão traducional (luc) uma vez que o códon inicial deve estar presente apenas na sequência do riboregulador, sob controle do promotor T7. Apresenta sítio de replicação ColE1 e o gene *AmpR*, que codifica a proteína de resistência a ampicilina. Este plasmídeo foi empregado como molde para amplificação do *switch* ZIKV1440(2.6) a ser utilizado nas clonagens.



Figura 13 Esquema ilustrativo do plasmídeo pT7luc(GCA)_ ZIKV1440-Switch.2.6_linker. São destacados no mapa do plasmídeo as sequências do promotor T7, do riboregulador ZIKV1440(2.6) e seu linker, do gene da luciferase, do promotor Amp e do gene de resistência a ampicilina. Fonte: O próprio autor, imagem gerada utilizando o software Benchling.

O vetor pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker (Figura 14), desenvolvido Zocca (2018), possui 4432 pares de bases de comprimento, sítio de replicação ColE1 e o gene *AmpR*, que codifica a proteína de resistência a ampicilina. Contém a sequência do *switch* DENV10550(2) entre o gene da luciferase de vagalume e o promotor T7. Este plasmídeo foi empregado como molde para obtenção do *switch* DENV10550(2) a ser empregado na construção dos sistemas de amplificação.

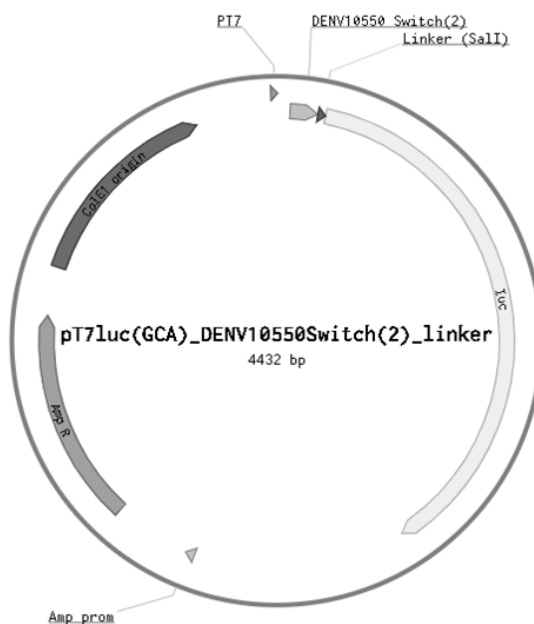


Figura 14 Esquema ilustrativo do plasmídeo pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker. São destacados no mapa do plasmídeo o promotor T7, o riboregulador DENV10550(2) e seu linker (que contém o sítio de restrição da enzima *SalI*), o gene da luciferase, o promotor Amp e o gene de resistência a ampicilina. Fonte: O próprio autor, imagem gerada utilizando o software Benchling

O vetor pZE27_GFP.pdt#5 (Figura 15) possui 2988 pares de bases de comprimento, contém o gene da proteína verde fluorescente GFP (do inglês, *green fluorescent protein*) fusionada a cauda pdt#5 sob controle do promotor *PlacI*, o gene *KanR* e *NeoR* que codifica a proteína de resistência a Canamicina em *E. coli* e neomicina em eucariotos, respectivamente. Apresenta também os sítios de replicação ColE1, pMB1, pBR322 e pUC. Este plasmídeo foi doado por Cameron e Collins (2014), sendo empregado para a produção GFP com a cauda pdt#5 em células BL21.

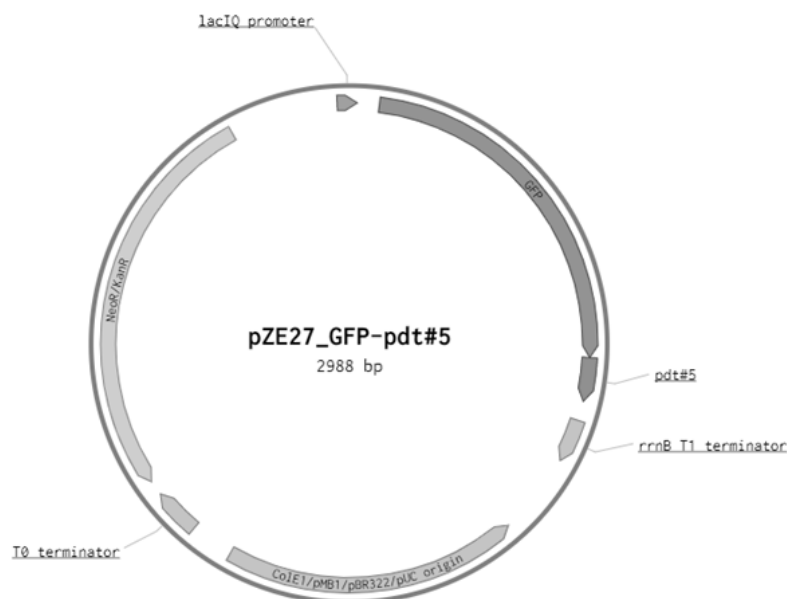


Figura 15 Esquema ilustrativo do plasmídeo pZE27_GFP.pdt#5. São destacados no mapa do plasmídeo: o promotor lacIQ, gene da GFP e a cauda pdt#5 fusionada a este, o terminador rrnB t1, uma parte que contém os sítios de replicação ColE1, pMB1, pBR322 e pUC, o terminador T0 e os genes de resistência KanR e NeoR. Fonte: O próprio autor, imagem gerada utilizando o software Benchling

O plasmídeo pSB1C3_spoVG_T7RNAPol (Figura 16) apresenta a sequência da T7 RNA Polimerase com o RBS spoVG flanqueado pelas sequências dos *Biobricks* prefixo e sufixo e o gene *CmR*, que codifica a proteína de resistência a cloranfenicol. Este vetor foi utilizado como molde para amplificação do gene da enzima T7 RNA polimerase.

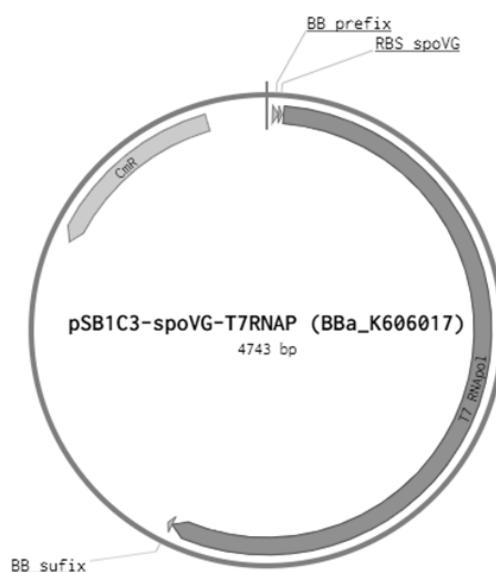


Figura 16 Esquema ilustrativo do plasmídeo pSB1C3_spoVG_T7RNAPol. São indicados no mapa do plasmídeo: o *BioBrick* prefixo, o sítio de ligação com o ribossomo spoVG, a T7 RNA

polimerase, o *BioBrick* sufixo e o gene de resistência a cloranfenicol Fonte: O próprio autor, imagem gerada utilizando o software Benchling.

O plasmídeo pSB1C3_AraC-pBAD_EPICluc (Figura 17) apresenta a sequência da luciferase EPICluc, escolhida como gene repórter por apresentar uma afinidade ao substrato 10 vezes maior e uma luminescência similar ao tipo selvagem (FUJII et al., 2007). Este vetor foi utilizado como molde para amplificação do gene da EPICluc a ser empregado nos sistemas de amplificação baseado na T7 RNA polimerase e no sistema das integrases.

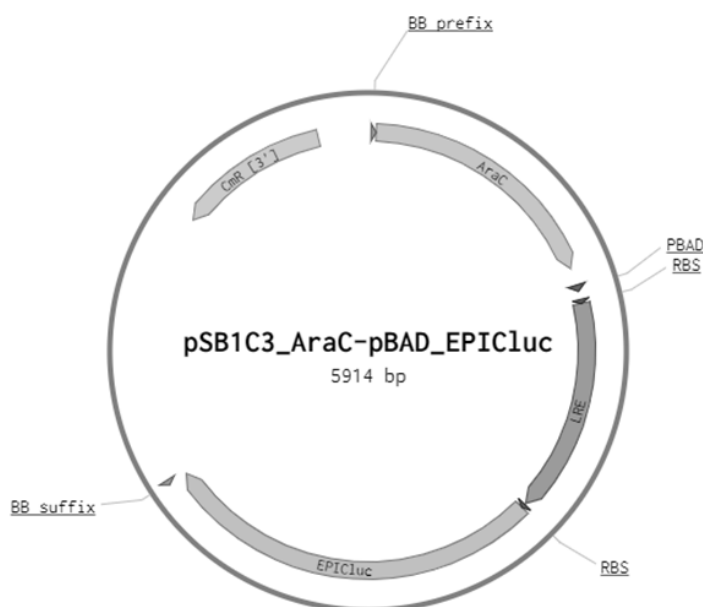


Figura 17 Esquema ilustrativo do plasmídeo pSB1C3_AraC-pBAD_EPICluc. São indicados no mapa do plasmídeo: o *BioBrick* prefixo, o gene da proteína reguladora AraC, o promotor pBAD, os genes da enzima regeneradora de luciferina (LRE), o gene da EPIC luciferase, o *BioBrick* sufixo e o gene de resistência a cloranfenicol Fonte: O próprio autor, imagem gerada utilizando o software *Benchling*.

O plasmídeo pECG_mCherry-pdt#3 (*L. lactis*) (Figura 18) apresenta a sequência da proteína fluorescente mCherry, sob controle do promotor P32, e do gene da protease mf-Lon sob controle do promotor *PnisA*. Além de conter as origens de replicação colE1 e AMB1, e os genes de resistência a ampicilina e eritromicina. Este vetor foi utilizado como molde para amplificação do gene da protease mf-Lon.



Figura 18 Esquema ilustrativo do plasmídeo pECG_mCherry-pdt#3. São indicados no mapa do plasmídeo: a proteína mCherry (rosa), sob controle do promotor P32 (azul), o gene da protease Mf-Lon (laranja) sob controle do promotor *nisA* (marrom), além das origens de replicação colE1 e AMB1, e os genes de resistência a ampicilina e eritromicina. Fonte: O próprio autor, imagem gerada utilizando o software *Benchling*.

A tabela 4 abaixo apresenta a sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a construção dos diferentes plasmídeos produzidos durante este trabalho.

Tabela 4 Lista de primer e oligonucleotídeos utilizados. Fonte: O próprio autor.

Id.	Oligo	Sequência
38	BioBrick-suffix_fw	TACTAGTAGCGGCCGCTGCAG
49	pSB1C3.seq_fw	ATAGGCGTATCAGCAGGC
50	pSB1C3.seq_rv	CGCGAAGTAATCTTTTCGG
111	PT7-RBS(BBP)_fw	GCTAGAAATCGCGGCCGCTTCTAGAGTAATACGACTCACTATAGGGTGTGCACAGAGGAGATAGTAGCG
112	PT7-RBS(Spel)_rv	CGCTACTAGTATCTCTCTGTGCACACCCCTATAGTGAGTCGTATTACTCTAGAAGCGGCCGCGAATCTTAGC
123	BBprefix_fw	ATGAGAAATCGCGGCCGCTTCTAG
124	BBsuffix_rv	CGGACTGCAGCGGCCGCTACTAG
158	J23119-DENV10550Switch2(BBP)_fw	GCTAGAAATCGCGGCCGCTTCTAGAGTTGACAGCTAGCTCAGTCTAGGTATAATGCTAGCACTAGATCCTCTAACCGCTAGTCTGCTAC
159	DENV10550Switch2(BBP)_rv	TCGAGTCGACTGCGTACAGCTTAGTC
160	T7 RNA pol-linker(SalI)_fw	GCTAGTCGACGTCGACTCGACGGCAGCGCAAAAGAACACGATTAACATCGCTAAGAACG
161	T7 RNA pol-rrnB term(BBs)_rv	TCGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTAGAGAGCGTTACCCGACAAACAAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTGATGCCTGGTTATTACGCGAACGCGAAGTCCGAC
210	PT7-mf-lon BBp_fw	CTGAGAAATCGCGGCCGCTTCTAGAGTAATACGACTCACTATAGGGATAAAGGAGGTATAAATGAGTAAAAATAAACTACCTATTTTCC
211	mf-lon BBs LI_rv	TTAGCTGCAGCGGCCGCTACTAGTACTCTTTTACGTTTCCGACG
229	Zikv1440-Switch.2.6(BBP)_fw	CTGAGAAATCGCGGCCGCTTCTAGAGTTGACAGCTAGCTCAGTCTAGGTATAATGCTAGCTTTCGCTCTATTCTCATCAGTTTC
255	PT7-Luc(BBP)_fw	CTATCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAATAATTTGTTAACTTAAAGAGGAGATATAATGGAGGACGCGAAAAACATC
256	PT7-Luc(BBs)_rv	GTGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTAACAGAAAAGCCGCGCTTTCCGGCGGCTTTGGTAGCGATCTACACTATCAGCGTATTACAACCTGGATTACCACT
397	EPICluc-RBS(BBP)_fw	CTATGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTAAGGAGGTAAAAAATGGAG
398	mf-lon (BBp-BsaI)_fw	TGCAGAAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGGTCTCAAGTAAAAATAAACTACCTATTTTCCAAAT
399	mf-lon (BBs)_rv	TTAGCTGCAGCGGCCGCTACTAGTACCCAAAGAGTTTGTAGAAACG
400	LinkerZIKV1440 (BBs-BsaI)_rv	TAGCACCTTGCCCTTTTTCGCGGAGGTCTCATCTCTTTTGCCTGCGCTCG
401	LinkerDENV10550 (BBs-BsaI)_rv	TAGCACCTTGCCCTTTTTCGCGGAGGTCTCATCTCTTTTGCCTGCGCCG
427	EPICluc(início).seq_rv	GTGATGTTAACTCGATATGCG
428	Pt7-ZIKVswitch2.6-bxb1_fw	CTGAGAAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCATTTCGCTTATCTCATCAGTTTCATGTCTGTGTCGGTCTTAGAACAGAGGAGATAAAGATGGACACAGGACACAAGCTCGAGGCAGCGCAAAAGCGTGCAGTGGTTGTTATTCG
429	Pt7-DENVswitch2-bxb1_fw	CTGAGAAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCATCTCTAACCGCTAGTCTGCTACCCCATGCGTACAGCTGTTATAGTTATGAACAGAGGAGACATAATATGACTAAGCTGTACGACGTGACTCGACGCGCAAAAGCGTGCAGTGGTTGTTATTCG
430	bxb1(SfiI)_rv	GATCGGCCTAGTGGCCTATAAACGCGAGAAAGGCC
431	attB-Pt7-attP (bxb1)_fw	ACATAGATTGCACTCGGCCGGCTTGTGCGACGCGCGGTCTCCGTCTCAGGATCATCCGGGCTGGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGGGTTGTACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACAGACAAACACGAA
432	attB-Pt7-attP (bxb1)_rv	CTAGTTCGTGGTTTGTCTGGTCAACCAACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAGCCGGATGATCCTGACGACGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCGAGTCGAATCTATGTAGC
453	Int9-attP-Pt7-attB_fw	AATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTTATATGCGAAAAATAATGGCGAACGAGGTAACCTGGATACCTACCGCAATTAATAAATTTGGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCTAATTGGAAGTTCGGAATAACTATGCAGATACCTGATACACACTTCCAACAAAAACAACCA
454	Int9-attP-Pt7-attB_rv	CTAGTGTGGTTGTTTGTGGAAAGTGTATCAGGTATCTGCATAGTATTCCGAACTTCCAATTAGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCACAAATTTAATTGGCGGATGAGGTATCCAGTTACCTCGTTCGCAATATTTTTCGCAATATAAACTCTAGAAGCGGCCGCG
455	Int13-attP-Pt7-attB_fw	AATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGCATACATTGTTGTTGTTTTCAGATCCAGTTGGTCTGTAAATATAAGCAATCCATGTGAGTTGGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCTATTCGGAGTTGTATTATGTTACTAAAAACAACCTGGTCAAGTTCTACAAATACAACCGTTATTGA
456	Int13-attP-Pt7-attB_rv	CTAGTCAATAACGGTTGTTTGTAGAAGTACCAAGTTGTTTGTAGTAAATATAAACTCCGAATAGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAACTCACATGGATTGCTTATTTACAGGACCAACTGGATCTGGAAAAACAACAATGTATGCCTCTAGAAGCGGCCGCG
457	TermB0015(PstI)_rv	GATCCTGCAGCGGCCGCTACTAGTATATAAACGCGAGAAAGGCC
458	BBp-Pt7_fw	CTGAGAAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAC

3.5. Clonagem gênica

A clonagem para construção dos dispositivos genéticos foi feita por meio de *BioBrick Assembly*, esta técnica utiliza-se de *cluster* de enzimas de restrição padronizadas denominados *BioBrick* prefixo, contendo os sítios de restrição das enzimas *EcoRI*, *NotI* e *XbaI* e *BioBrick* sufixo, com os sítios para *SpeI*, *NotI* e *PstI*. Estas partes flanqueiam as sequências de DNA de interesse e são empregadas na adição de novas sequências ao plasmídeo, como ilustrado na figura 19.

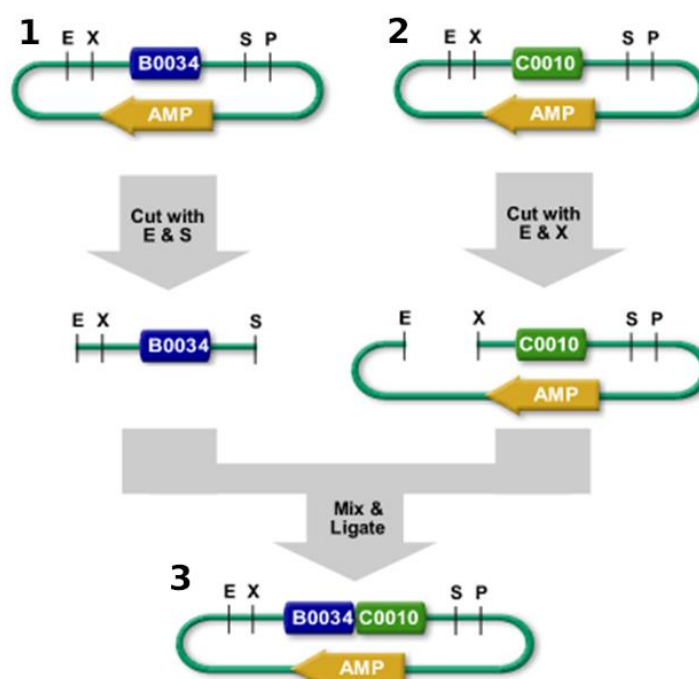


Figura 19 Esquema ilustrativo da clonagem *BioBrick*. O plasmídeo 1 possui inserto azul que se deseja inserir no plasmídeo 2 que tem o inserto verde. Para isso, o plasmídeo 1 é digerido com as enzimas *EcoRI* (E) e *SpeI* (S) e o plasmídeo 2 é digerido com as enzimas *EcoRI* (E) e *XbaI* (X). Os cortes realizados pelas enzimas de restrição *XbaI* e *SpeI* deixam extremidades coesivas complementares entre si, no entanto ao serem ligadas formam uma cicatriz *XbaI/SpeI* que não reconstitui nenhum dos sítios de restrição. Fonte: *Registry of Standard Biological Parts*.

Neste método de clonagem a ligação dos cortes realizados pelas enzimas *XbaI* e *SpeI* formam uma “cicatriz” em que não se restitui nenhum dos sítios de restrição para essas duas enzimas. A clonagem *BioBrick* permite realizar uma clonagem direcional, rápida e fácil, e ainda permite recuperar os sítios de restrição do prefixo e do sufixo para que possam ser utilizados para adição de novos insertos, que possuam os *BioBricks*, ao mesmo plasmídeo.

Para diminuir a probabilidade de clonagens falso positivas por meio da religação do vetor plasmidial, estes foram desfosforilados empregando a enzima *FastAp* (*Thermo Fisher Scientific*) durante a digestão com as enzimas de restrição adequadas. Já os insertos produtos de PCR foram tratados com a enzima *DpnI*, capaz de digerir DNA metilado, a fim de eliminar o DNA molde utilizado na reação de amplificação.

3.5.1. Reação de amplificação em cadeia (PCR)

As reações de PCR foram realizadas utilizando a enzimas “*Phusion High-Fidelity Polymerase*” ou “*Time Hifi DNA Polymerase*”. As reações foram montadas no gelo e transferidas rapidamente para o termociclador pré-aquecido a temperatura de desnaturação (98°C). Todos os componentes foram homogeneizados e centrifugados previamente ao uso, sendo DNA polimerase adicionada por último para prevenir qualquer degradação dos primers, devido a atividade de exonuclease na posição 3'→5' de ambas as enzimas. Estas DNA polimerases são capazes de amplificar mil bases em 30 segundos, logo o tempo de extensão foi calculado de acordo com o tamanho da sequência de interesse a ser amplificada. A montagem da reação foi realizada como descrito na tabela 5.

Tabela 5 - Protocolo para montagem da reação de PCR. Fonte: O próprio autor.

Componente	Concentração final
Tampão 5X	1X
10 mM dNTPs	200 µM
10 µM primer <i>forward</i>	0.5 µM
10 µM primer <i>reverse</i>	0.5 µM
DNA molde	20 a 80 ng
DMSO (opcional)	3%
DNA pol	0,02 U/µl
H ₂ O deonizada	Completar para 20 ou 50 µL

Após agitou-se gentilmente a reação e centrifugou-se rapidamente em microcentrífuga. Os tubos foram colocados no bloco do termociclador, pré-aquecido com temperatura da tampa em 105°C, e as condições da ciclagem foram definidas como apresentado na tabela abaixo (Tabela 6).

Tabela 6 - Condições da ciclagem do termociclador. Fonte: O próprio autor.

Passos	N. de ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1	98°C	30 segundos
Desnaturação	25 a 35	98°C	5 a 10 segundos
Anelamento dos <i>primers</i>		(T _m – 5°C)	10 a 30 segundos
Extensão		72°C	30 segundos por kb
Extensão final	1	72°C	5 a 10 minutos
Espera	1	4°C	∞

3.5.2. Digestão enzimática

- ***FastDigest* (Thermo Scientific)**

As enzimas *FastDigest* possuem têm 100% de atividade no mesmo tampão, o tampão *FastDigest*, podendo ser utilizadas em conjunto desde que o volume somado das enzimas não ultrapasse 10% do volume total da reação, a fim de evitar acúmulo de glicerol. Podem ser utilizadas na digestão de plasmídeos e produtos de PCR com tempo de incubação curto. A montagem da reação, em microtubo, se dá como descrito na tabela 7 abaixo.

Tabela 7 Protocolo para montagem de reação de digestão *FastDigest*. Fonte: O próprio autor

Componente	Concentração
DNA	X µL (500-1000 ng)
Enzima(s) <i>FastDigest</i>	0,5-1 U
10X <i>FastDigest Buffer</i>	1X
H ₂ O deionizada	Para 20 µL
Volume total = 20 µL	

A reação foi incubada a 37°C em um termobloco ou banho-maria por 1 hora. As enzimas foram inativadas por aquecimento (quando possível) ou purificou-se a reação utilizando um kit de purificação comercial (GENECLEAN® Turbo (MPBIO) ou Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)). Na digestão de vetores também foi empregada a enzima fosfatase *FastAP* (Thermo Scientific).

Utilizou-se o tampão *FastDigest Green* para a digestão para confirmação do padrão de bandas por eletroforese, sendo a reação de digestão incubada a 37°C em banho seco ou banho-maria durante 15 a 30 min. Após, aplicou-se uma alíquota da digestão diretamente no poço do gel para a corrida eletroforética.

- **Enzimas NEB (*New England Biolabs*)**

Nas reações utilizando enzimas NEB para digestão de plasmídeos e produtos de PCR observou-se o tampão que possibilitaria a maior atividade para as enzimas empregadas, as enzimas NEB apresentam diferentes eficiências em diferentes tampões (*CutSmart*, *NEBuffer*, etc). O volume das enzimas não ultrapassou 10% do volume total da reação para evitar o acúmulo de glicerol na reação. A montagem da reação, em microtubo, se deu como descrito na tabela 8 abaixo.

Tabela 8 Protocolo para montagem de reação de digestão NEB. Fonte: O próprio autor.

Componente	Concentração
DNA	500-1000 ng
Enzima(s) NEB	1-2 U
10X NEB Buffer	1 X
H ₂ O deionizada	Completar para volume final
Volume total = 10 ou 20 µL	

A reação foi incubada a 37°C em banho seco ou banho-maria durante 1 a 2 horas. As enzimas foram inativadas por aquecimento (quando possível) ou purificou-se a reação utilizando um kit de purificação, GENECLAN® Turbo (MPBIO) ou Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

3.5.3. Precipitação do DNA utilizando etanol e acetato de sódio 3M

Uma alternativa de purificação para as digestões (em vez de se usar um kit comercial) e o método para purificar os DNAs (plasmidial ou oligonucleotídeo) e RNAs a serem utilizados nas reações *in vitro* foi a precipitação de ácidos nucleicos por etanol e acetato de sódio.

Para isso, adiciona-se um sal catiônico em alta concentração, no caso acrescentou-se acetato de sódio 3 M em um volume correspondente a 10% da

amostra (por exemplo, 2 µL para 20 µL de uma reação de digestão), e etanol absoluto em um volume correspondente a 3 vezes o volume da reação (60 µL para 20 µL de uma reação de digestão). A mistura foi homogeneizada e incubada durante uma hora a 80°C negativos ou durante a noite a 20°C negativos. Após incubação, centrifugou-se os microtubos durante 30 minutos a 13.000 rpm a uma temperatura de 4°C. Em seguida, removeu-se cuidadosamente o sobrenadante para não afetar o *pellet* formado. O etanol induz a transição estrutural nas moléculas de ácido nucleico, fazendo-as se agregarem e assim precipitar. A precipitação com etanol absoluto, além de concentrar o DNA/RNA, ajuda a remover resíduos presentes na amostra. Na próxima etapa adicionou-se 50 µL de etanol 70% e seguiu-se para uma nova centrifugação a 4°C durante 5 minutos na velocidade máxima (13.000 rpm ou 17.000 x g), o etanol 70% é utilizado para remover os resíduos de sais. Depois da segunda centrifugação removeu-se novamente o sobrenadante e incubou-se os microtubos em banho seco por 10 minutos a 45°C até que todo o etanol evaporasse.

Por fim, o DNA/RNA foi ressuspendido em água deionizada ou em água livre de nucleases (no caso das amostras para as reações *in vitro*) com ajuda do agitador vórtex. O ácido nucleico purificado foi quantificado em leitura de placas Infinite® M200 Pro (Tecan).

3.5.4. Ligação com T4 DNA ligase

Com as partes devidamente digeridas fazendo com que o(s) inserto(s) e o vetor de DNA apresentem extremidades coesivas, realizou-se a ligação das partes biológicas e do vetor de DNA utilizando a enzima T4 DNA ligase (*Thermo Scientific*). A montagem da reação em microtubo se deu como descrito na tabela 9 e a reação de ligação foi incubada a 22°C em um por 1 hora. O cálculo da razão molar entre vetor e inserto foi feito utilizando a ferramenta online *Ligation Calculator* (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html), que leva em consideração a quantidade de vetor a ser utilizado e o tamanho do vetor e do inserto, dando como resposta a quantidade de DNA do inserto a ser adicionada na reação. Usualmente para insertos grandes.

Tabela 9 Protocolo para montagem de reação de ligação entre as partes de DNA. Fonte: O próprio autor.

Componente	Quantidade
DNA plasmidial linearizado	20-100 ng
DNA inserto(s)	- ng
10X T4 DNA ligase <i>buffer</i>	1 x
T4 DNA ligase	1 Weiss U (0,5-1,0 µL)
H ₂ O deionizada	Para 10 µL

A reação de ligação foi utilizada diretamente para transformação por choque térmico em 50 µL de células *E. coli* Top 10 quimicamente competentes.

3.5.5. Transformação em *E. coli* quimicamente competente por choque térmico

Para a transformação primeiramente descongelou-se as células de *E. coli* competentes, previamente guardadas no ultra freezer a -80°C, em banho de gelo. Para cada transformação foram usados 50 µL da preparação de células competentes. Em seguida, adicionou-se 20-50 µg de plasmídeo intacto ou os 10 µL da reação de ligação à 50 µL de células competentes. A mistura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos seguindo depois para choque-térmico (incubada em banho-maria a 42°C por 30 segundos e imediatamente transferida para banho de gelo durante 2 minutos). Após, adicionou-se 250 µL de meio SOC a cada transformação e estas foram incubadas por 1h a 37°C e 220 rpm (rotações por minuto) ou mais.

As transformações foram semeadas em placas de petri contendo meio LB sólido, com adição do antibiótico correspondente a resistência do plasmídeo transformado, e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C durante a noite. As colônias isoladas foram repicadas em meio LB líquido com o antibiótico adequado e incubadas a 37° C por 16 a 18 horas em agitação de 220 rpm.

3.6. Confirmação da clonagem

3.6.1. PCR de colônia

A PCR de colônias foi empregada na tentativa de confirmar as colônias positivas quando o controle da transformação (células transformadas com a ligação em que não foi adicionado inserto apenas o vetor digerido) apresentou muitas colônias, assim selecionou-se diversas colônias das placas com transformação

positiva (células transformadas com a ligação do vetor mais o inserto). Nesta reação de amplificação empregou-se a enzima Taq DNA polimerase (*Thermo Scientific*). Esta enzima não possui leitura de prova, ou seja, não apresenta atividade de exonuclease na posição 3'→5'. Tal DNA polimerase é capaz de amplificar mil bases a cada minuto, assim o tempo de extensão foi calculado de acordo com o tamanho da sequência de interesse a ser amplificada e foram acrescidos 30 segundos neste tempo a fim de garantir que se houvesse uma amplificação errônea esta apresentaria uma banda maior que a banda de interesse. Nesta reação de amplificação a colônia foi repicada usando uma ponteira e eluída em 15,5 µL de água deionizada. A montagem da reação é dada na tabela 10.

Tabela 10 -Protocolo para montagem da reação da PCR de colônia. Fonte: O próprio autor.

Componente	Volume final 20 µl	Concentração final
H ₂ O deionizada	15,5 µL	
<i>Green Taq Buffer</i> 10 X	2 µL	1X
10 mM dNTPs	0.4 µL	200 µM
10 µM primer <i>forward</i>	1 µL	0.5 µM
10 µM primer <i>reverse</i>	1 µL	0.5 µM
DNA pol	0.2 µL	1,25 U

Os tubos com a reação montada foram homogeneizados, centrifugados e por fim colocados no bloco do termociclador com as condições da ciclagem apresentadas na tabela 11.

Tabela 11 - Ciclagem da PCR de colônia. Fonte: O próprio autor.

Passos	N. de ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1	98°C	2 minutos
Desnaturação	25 a 40	98°C	30 segundos
Anelamento dos primers		(T _m – 5°C) °C	30 segundos
Extensão		72°C	1 minuto por kb
Extensão final	1	72°C	5 a 15 minutos
Espera	1	4°C	∞

Ao fim da amplificação, 5 µL de cada reação foi aplicado em um poço do gel de agarose 1% para análise do padrão de bandas. As colônias que apresentaram bandas

no tamanho da banda de interesse foram repicadas em uma pré-cultura para posterior extração do DNA plasmidial.

3.6.2. Eletroforese em gel de agarose

A confirmação preliminar da clonagem foi realizada por meio de análise de tamanho banda em eletroforese em gel de agarose 1%, após extração dos plasmídeos com o kit “*PureYield™ Plasmid Miniprep System*” (Promega) e digestão destes com enzimas de restrição específicas, comumente empregando-se uma enzima do prefixo (por exemplo, a *EcoRI*) e uma do sufixo (por exemplo, a *PstI*), sendo assim possível visualizar duas bandas no gel uma referente ao vetor e outra ao inserto.

O gel de agarose 1% para foi feito dissolvendo-se 1% (m/v) de agarose em tampão TAE 1X e acrescentando brometo de etídeo ou SYBR™ Safe (Invitrogen), para corar o DNA, na proporção 1 µL de corante para 10 mL de gel. Após o preparo do gel, este foi colocado na cuba de eletroforese e as amostras e o marcador de peso molecular foram aplicados em poços individuais. A corrida foi realizada com voltagem constante em 100-110V durante 35-45 min. Após a corrida, uma foto do gel foi retirada no fotodocumentador.

3.6.3. Sequenciamento de DNA

A confirmação da sequência nucleica foi realizada por sequenciamento empregando o método de Sanger, foram selecionados para sequenciamento apenas os plasmídeos que apresentaram previamente o padrão de banda esperado na eletroforese.

Para o sequenciamento, de 200 a 500 ng de cada amostras de DNA plasmidial foram utilizadas na PCR. A PCR do DNA a ser sequenciado foi feita utilizando o kit de sequenciamento contendo o reagente *BigDye® Mix Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)* que possui dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl₂ e tampão Tris-HCl. A reação foi montada em microtubo de 200 µL adicionando os componentes apresentados na tabela 12, em seguida foi incubada no termociclador com a ciclagem da amplificação definida como descrito na tabela 13.

Tabela 12 Reagentes da PCR para sequenciamento. Fonte: O próprio autor.

Reagente	Volume
<i>BigDye® Mix</i>	1 µL
Tampão de sequenciamento 5X	3,5 µL
<i>primer</i> (3,2 uM)	2 µL
DNA molde	x µL
Água livre de nuclease	Completar para 20 µL

*x corresponde ao volume suficiente para 200 a 500 ng de DNA

Tabela 13 Programa da ciclagem da PCR de sequenciamento. Fonte: O próprio autor.

Etapas	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	96°C	1 minuto	1X
Desnaturação	96°C	10 segundos	25X
Anelamento	Y*	5 segundos	
Extensão	60°C	4 minutos	
Extensão final	60°C	5 minutos	1X

*Y corresponde à temperatura de anelamento do primer ao DNA molde e nesta reação não deve ser maior que 56°C.

O produto desta PCR foi purificado utilizando o kit “*BigDye® Xterminator™ Purification kit*” (Applied Biosystems). Primeiramente foram adicionados 45µL do reagente SAM™ Solution, seguido pela adição de 10µL da resina Xterminator™ ao microtubo contendo o produto da reação de PCR. Após, os microtubos foram colocados em um agitador por 30 minutos a 2.100 rpm, sendo estes mantidos protegidos da luz. Passado este intervalo, a amostra foi centrifugada em velocidade máxima brevemente e 20 µL do sobrenadante resultante foram pipetados em uma placa de sequenciamento. O sequenciamento foi feito no sequenciador 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

3.7. Sistemas de amplificação de sinal baseados na T7 RNA polimerase

Neste circuito sintético indireto os riborreguladores foram clonados individualmente no plasmídeo pSB1C3 entre o promotor J23119 (promotor forte e constitutivo) e o gene da T7 RNA polimerase por meio de *BioBrick assembly*, desse modo a tradução da T7 RNA polimerase é controlada pelo *switch*. Após a confirmação da construção desta primeira unidade por sequenciamento, a segunda unidade de transcrição foi adicionada ao vetor contendo o gene repórter *EPIC* luciferase sob controle do promotor T7, também por meio de *BioBrick assembly*. Devido à natureza de inserção sequencial de partes biológicas da clonagem *BioBrick* plasmídeos

intermediários também foram gerados durante a construção do dispositivo único (contendo as duas unidades de transcrição), foram construídos os plasmídeos intermediários pSB1C3_SwitchDENV10550(2)_T7RNAPol, pSB1C3_SwitchZIKV1440(2.6)_T7RNAPol e pSB1C3_PT7-EPICluc.

A ativação do sistema é baseada na presença do RNA *trigger* sintético específico, este inicia a ativação do módulo de detecção interagindo com o switch e liberando a tradução da T7 RNA polimerase, esta proteína promoverá a transcrição do gene repórter que será traduzido na reação (Figura 20). Os plasmídeos construídos foram nomeados pSB1C3_SwitchDENV10550(2)_T7RNAPol_EPICluc e pSB1C3_EPICluc_SwitchZIKV1440(2.6)_T7RNAPol, de acordo com as partes biológicas contidas neles.

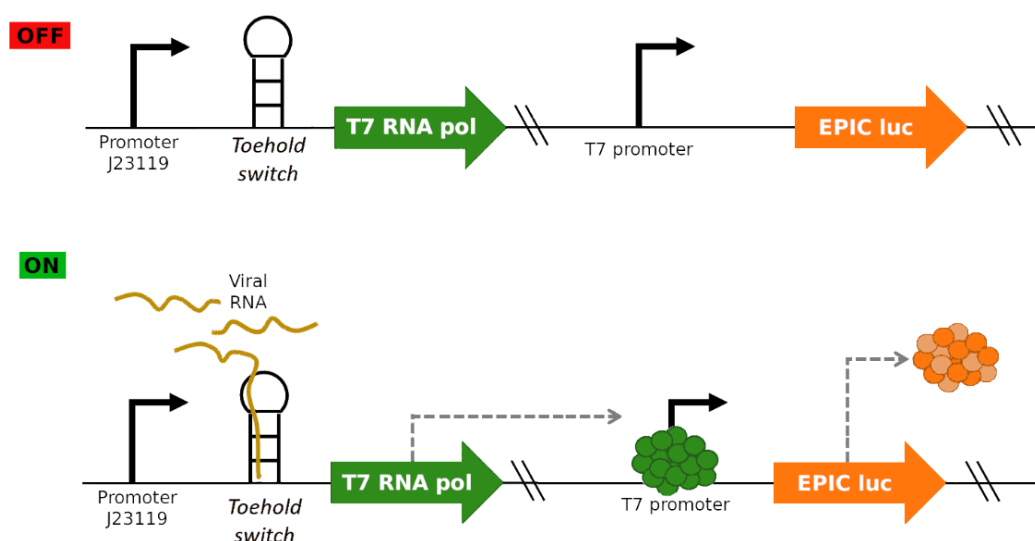


Figura 20 Esquema ilustrativo do funcionamento do sistema de amplificação de sinal baseado na atividade da T7 RNAPol. Na figura, o processo de transcrição e a molécula de mRNA do gene da T7 RNA pol e da EPIC luciferase estão suprimidos e para melhor entendimento apresentasse ainda o *hairpin* no estado ON mesmo que este se desestruturasse com a ligação do RNA *trigger*. No estado OFF (parte superior da figura) a estrutura secundária formada pelo *switch* previne a expressão da T7 RNA polimerase. No estado ON (parte inferior da figura), a partir da ligação do RNA alvo específico, o *hairpin* é resolvido, permitindo que a RNA polimerase seja expressa (conjunto de círculos verdes) e assim passe a atuar no promotor T7 da segunda unidade de transcrição levando, por fim, a expressão do gene repórter EPIC luc (conjunto de círculos alaranjados). Fonte: O próprio autor.

Sabe-se que a T7 RNA polimerase apresenta atividade quando sintetizada em reação de expressão gênica *in vitro* (GARAMELLA et al., 2016). Desta forma, a enzima é uma opção viável para a construção do sistema de amplificação.

Para construção do módulo de detecção deste sistema com o *switch* DENV10550(2), foi realizada primeiramente a amplificação deste riboregulador utilizando os oligonucleotídeos 158 *foward* (fw), complementar ao início do inserto, além de conter o promotor J23119 e o *BioBrick* prefixo, e *primer* 159 *reverse* (rv), que possui o *BioBrick* sufixo e é complementar à região do *linker* (que apresenta o sítio da enzima *Sall*), e aplicando como molde o plasmídeo pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker.

O inserto da T7 RNA pol foi amplificado com os iniciadores 160 fw, que adiciona o sítio da *Sall* e inicia a amplificação da polimerase após o códon inicial, e iniciador 161 rv, complementar ao final do gene *T7RNAPol*, além de conter o terminador *rrnB* e o *BioBrick* sufixo, utilizando-se como molde o plasmídeo pSB1C3_spoVG_T7RNAPol. Os insertos obtidos, *switch* DENV10550(2) e T7 RNA pol, foram ligados por meio da *overhang* gerada pela digestão com *Sall* e clonados no *backbone* pSB1C3 por *BioBrick assembly* gerando o plasmídeo intermediário pSB1C3_DENV10550Switch2_T7RNAPol. O inserto do riboregulador ZIKV1440(2.6) ligado a polimerase já havia sido construído por Paiva (2018), sendo apenas transferido do plasmídeo pSignalAmp para o vetor pSB1C3, utilizado como base para todas as construções desse trabalho.

Em relação ao módulo de resposta, a construção se iniciou com a amplificação do inserto utilizando o plasmídeo pSB1C3_AraC-pBAD_EPICluc como molde, este plasmídeo contém a sequência da EPIC Luciferase sob controle do promotor PBAD, induzível por arabinose. Os *primers* utilizados foram o 255 *foward*, que contém o *BioBrick* prefixo, o promotor T7 e um RBS forte para expressão *in vitro* (UTR1), e o oligonucleotídeo 256 *reverse*, complementar ao final do gene, além de portar o terminador T500 e *BioBrick* sufixo. Ambos oligonucleotídeos estão descritos na tabela 10. Com o inserto PT7_EPICluc em mãos seguiu-se para digestão e clonagem no vetor pSB1C3 por *BioBrick assembly* gerando o terceiro plasmídeo intermediário deste sistema, pSB1C3_PT7-EPICluc.

A construção dos módulos foi verificada pelo sequenciamento das sequências nucleicas através do método de Sanger, e uma vez confirmada partiu-se para a construção do dispositivo em plasmídeo único também por *BioBrick assembly*. Duas estratégias de clonagem foram empregadas, uma buscando introduzir o inserto PT7_EPICluc no plasmídeo contendo o módulo de detecção a partir do *BioBrick*

prefixo e outra tentando incorporá-lo a partir do *BioBrick* sufixo, uma vez que a ordem dos módulos no plasmídeo não é importante pois ambos são compostos por unidade de transcrição completas, contendo promotor, RBS, ORF (do inglês, *Open read frame*) e terminador. Assim construiu-se o vetor pSB1C3_DENV10550Switch2_T7RNApol_EPICluc, pela clonagem do módulo de resposta no *BioBrick* sufixo, e o plasmídeo pSB1C3_EPICluc_ZIKV1440Switch2.6_T7RNApol, com a introdução do módulo de resposta no *BioBrick* prefixo.

3.8. Sistemas de sinalização empregando a protease *mf-Lon*

Na construção planejada deste dispositivo, os circuitos sintéticos conteriam os riboreguladores entre o promotor J23119 e o gene da protease *Mf-Lon*, desse modo a tradução da protease é controlada pelo *switch*. Neste sistema a reação expressão gênica *in vitro* possui inicialmente a fluorescência da proteína verde fluorescente que deverá ser extinta caso o teste seja positivo, ou seja, na presença do RNA *trigger* específico a protease será expressa e degradará a GFP, que possui a cauda de degradação pdt#5 específica para tal *Lon*-protease, presente na reação (Figura 21). Diferentemente dos outros dois dispositivos de sinalização do trabalho, este sistema trata-se de um circuito direto, uma vez que há apenas uma etapa para ativação. No entanto a resposta é indireta, definida pela degradação ou não da proteína fluorescente presente na solução, assim esta cascata de sinalização geraria uma resposta mais prolongada, uma vez que a resposta fica menos dependente da quantidade de RNA viral na amostra sendo decorrente a atuação da proteína intermediária, a protease.

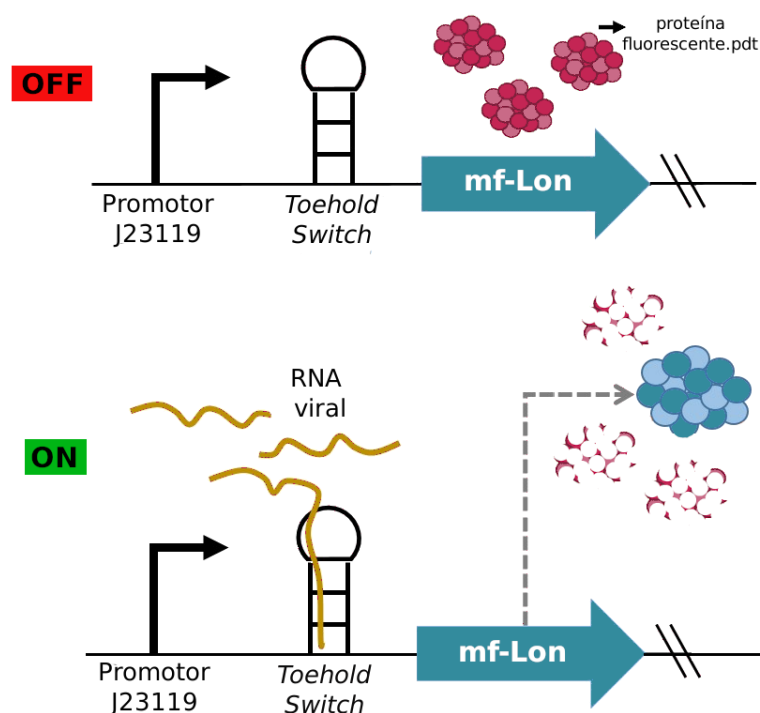


Figura 21 Esquema ilustrativo do funcionamento do sistema sinalização utilizando a protease mf-Lon como gene repórter. Na figura, o processo de transcrição e a molécula de mRNA do gene mf-Lon estão suprimidos e para melhor entendimento apresentasse ainda o *hairpin* no estado ON mesmo que este se desestruture com a ligação do RNA *trigger*. No estado OFF (parte superior da figura) a estrutura secundária formada pelo *switch* previna a expressão da mf-Lon e a fluorescência da proteína fluorescente não é afetada (representada pelos conjuntos de círculos avermelhados). No estado ON (parte inferior da figura), a partir da ligação do RNA cognato transativador, o *hairpin* é resolvido, fazendo com que a protease Lon possa ser expressa e assim passe a degradar as proteínas fluorescentes com a cauda de degradação, fazendo com que a fluorescência da reação diminua (representada na figura pelos conjuntos de círculos avermelhados sumindo). Fonte: O próprio autor.

Para construir tais dispositivos, primeiramente amplificou-se as partes dos riboreguladores utilizando os oligonucleotídeos 158 *forward* e 401 *reverse*, que é complementar ao final do inserto e contém os sítios da enzima *BsaI* seguido do *BioBrick* sufixo, aplicando como molde o plasmídeo pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker para o *switch* DENV10550(2). No caso do *switch* ZIKV1440(2.6), empregou-se os iniciadores 229 fw, complementar ao início do inserto, contendo o *BioBrick* prefixo e o promotor J23119, e *primer* 400 rv, complementar ao *linker*; apresentando o sítio da enzima *BsaI* seguido do *BioBrick* sufixo, e aplicou-se o vetor pT7luc(GCA)-ZIKV1440-Switch.2.6_linker como molde da reação de PCR. Assim obteve-se os insertos dos riboreguladores sob controle do promotor J23119 e contendo o sítio de restrição da *BsaI* ao final da sequência do *linker*.

No próximo passo, adquiriu-se o inserto mf-Lon por PCR adicionando como molde o plasmídeo pECG_mCherry-pdt#3 e empregando os *primers* 398 fw, complementar ao início do gene (excluindo o ATG), possuindo o *BioBrick* prefixo e os sítios da enzima *BsaI*, e o oligonucleotídeo 399 rv, complementar ao final do gene e contendo o *BioBrick* sufixo. Seguiu-se então para a digestão das partes, os riboreguladores foram cortados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BsaI* e a da protease com *BsaI* e *PstI*. Os insertos digeridos foram unidos a partir das *overhangs* da digestão com a *BsaI* e clonados no plasmídeo pSB1C3 por meio de *BioBrick assembly*.

Também se construiu o plasmídeo pSB1C3_PT7_mf-Lon para se avaliar a atividade da Lon protease sem regulação por um *switch* no ambiente de expressão *in vitro*. Para tanto amplificou-se a sequência da protease com os iniciadores 210 forward, complementar ao início do gene e apresentando *BioBrick* prefixo e o promotor PT7, e 211 reverse, que contém o *BioBrick* sufixo e é complementar ao final do terminador do gene *mf-Lon*, utilizando como molde o plasmídeo pECG_mCherry-pdt#3, gerando o inserto PT7_mf-Lon clonado por meio de *BioBrick assembly* no plasmídeo *backbone* pSB1C3 produzindo o vetor pSB1C3_PT7_mf-Lon.

3.8.1. Produção de GFP.pdt#5

Neste sistema a protease foi testada como gene repórter na reação de expressão gênica *in vitro*. Para tanto, utilizou-se a proteína fluorescente GFP fusionada à pdt#5, esta foi empregada na reação de expressão gênica *in vitro* deste sistema, sendo adicionada na reação previamente.

Desse modo, anteriormente à expressão gênica *in vitro* do sistema da protease, obteve-se a proteína fluorescente com a cauda de degradação. Para isto, células de *E. coli* BL21 quimicamente competentes foram transformadas com o plasmídeo pZE27_GFP#5. Colônias isoladas positivas foram pré-incubadas em 5 mL de meio LB líquido contendo canamicina (50 µg/mL) durante a noite a 37 °C e 220 rpm. No dia seguinte, realizou-se o cultivo em frascos Erlenmeyer de 500 mL, nestes adicionou-se um volume final 100 mL de meio LB líquido contendo canamicina (50 µg/mL) com a densidade óptica (D.O.) inicial da cultura de 0,02 (medida no comprimento de onda de 600 nm). Incubou-se o cultivo a 37 °C e 220 rpm até que este alcançasse a D.O. de 0,4 (referente a fase exponencial de crescimento do microrganismo) para que

então fosse adicionado IPTG (400 μ M) afim de induzir a expressão da proteína fluorescente, a linhagem BL21 expressa a enzima T7 RNA polimerase a partir da indução com IPTG. Antes da indução, uma alíquota de 1,5 mL foi retirada marcando o ponto zero da indução. Depois de induzido, o cultivo foi incubado a 37 °C e 220 rpm durante 7 horas. Ao final deste tempo, a cultura foi transferida para tubos Falcon de 50 mL e centrifugada durante 10 min a 5000 G, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensionado em tampão fosfato (ph 7,5). Para obtenção da GFP.pdt#5 realizou-se o rompimento celular do microrganismo produtor por meio de 10 ciclos de congelamento e descongelamento, seguido de sonicação para garantir o rompimento do máximo de células possível. A sonicação foi realizada a 99% da potência máxima (20.000 Hz) por meio de 10 ciclos, cada ciclo composto de 30 segundos de choque ultrassônico e 5 minutos de descanso em gelo. Recuperou-se o sobrenadante contendo a proteína fluorescente após centrifugação dos tubos Falcon de 50 mL contendo o lisado a 29.300 G durante 30 min.

3.8.2. SDS-PAGE

Para confirmação da expressão da protease mf-Lon *in vitro* foi realizado SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970). Na preparação da amostra os 10 μ L da reação de expressão gênica *in vitro* realizada foram adicionados à 90 μ L do tampão Laemmli e homogeneizados, a mistura foi incubada durante 10 minutos a 99 °C em banho-seco para desnaturação das proteínas.

Iniciou-se a montagem dos géis com o gel de separação (gel inferior), este foi polimerizado durante 30-45 minutos. Em seguida, preparou-se o gel de resolução (gel superior), polimerizado durante 20-30 minutos. Na elaboração dos géis foi utilizada a solução de 30 % de acrilamida/bis-acrilamida (BioRad) e estes foram preparados como descrito anteriormente no tópico de soluções.

Na aplicação das amostras nos géis foram adicionados 10 μ L de cada mistura homogeneizada e desnaturada, logo em um poço aplicou-se a reação controle e em outro a reação de expressão *in vitro* da protease (ensaio utilizando o plasmídeo pSB1C3_PT7_mf-Lon), os géis foram corridos em um sistema Mini-PROTEAN Tetra (BioRad) banhados em tampão de corrida. Aplicou-se uma corrente elétrica de 20 mA, 80 V, durante 2 horas (a amperagem foi mantida constante). O gel de proteína foi então incubado durante 1 hora na solução fixadora. Em seguida, incubou-se na

solução reveladora durante a noite. Após a coloração, o excesso de corante do gel foi removido por meio de banhos em água destilada e álcool.

3.9. Sistemas de amplificação de sinal baseados em integrases

Inicialmente planejou-se testar apenas a integrase Bxb1 nesse trabalho, posteriormente surgindo a oportunidade de serem empregadas também as integrases Int 9 e Int 13. Na estratégia inicial de amplificação de sinal aplicando uma integrase, cada riborregulador (DENV10550 2.0 ou ZIKV1440 2.6) seria clonado, separadamente, no plasmídeo pSB1C3 entre o promotor T7 e o gene de uma integrase. Uma segunda unidade de transcrição seria adicionada ao vetor contendo o gene repórter EPIC luciferase sob controle do promotor T7, no entanto este segundo promotor T7 estaria orientado no sentido oposto ao gene repórter e flanqueado pelos sítios de recombinação específicos (*attB* e *attP*) da integrase utilizada no módulo de detecção. Neste contexto, na ausência do RNA viral alvo, o gene repórter não seria expresso. Já na presença do RNA *trigger* específico, a integrase é expressa na reação de expressão gênica *in vitro* e atuará nos sítios de recombinação promovendo a inversão do promotor na direção correta (atividade *flip* recombinase) (SIUTI et al., 2013) levando, enfim, a transcrição e posterior tradução do gene da EPIC luciferase indicando a resposta positiva (Figura 22).

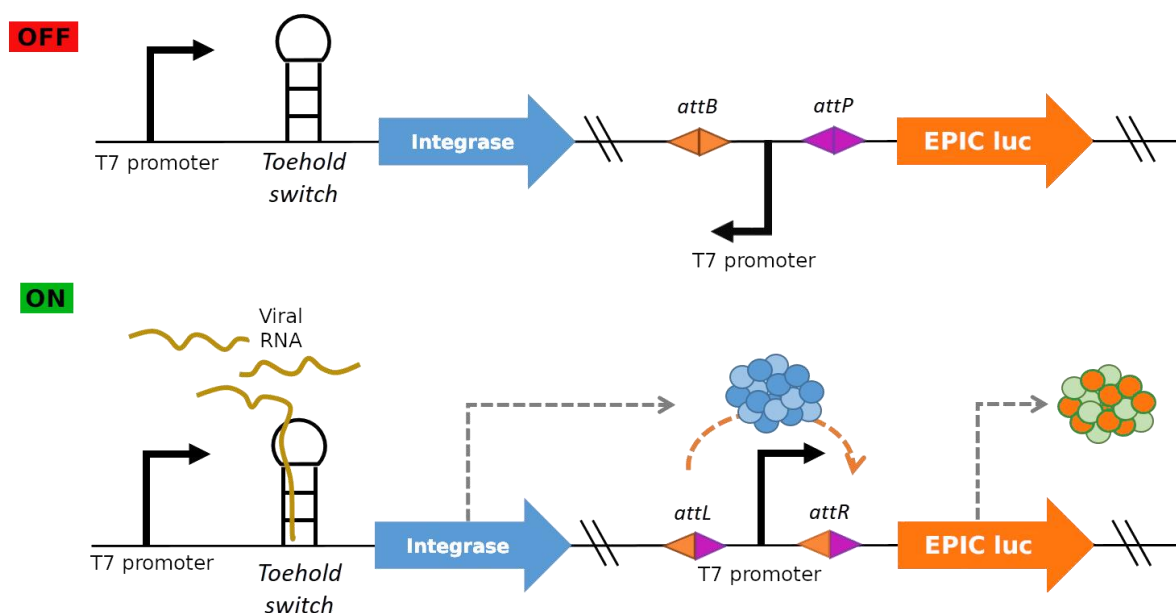


Figura 22 Esquema ilustrativo do funcionamento do sistema de amplificação de sinal baseado na atividade *flip* recombinase de uma integrase de serina. Na figura, o processo de transcrição e a molécula de mRNA do gene da integrase e da EPIC luciferase estão suprimidos. No estado

OFF (parte superior da figura) o *hairpin* formado pelo *switch* previne a expressão da integrase. No estado ON (parte inferior da figura), a partir da ligação do RNA alvo específico, o *hairpin* é resolvido, permitindo que a integrase seja expressa (conjunto de círculos azuis) e assim passe a atuar nos sítios de reconhecimento *attB* (losango laranja) e *attP* (losango rosa) que flanqueiam o promotor T7 invertido da segunda unidade de transcrição, levando à inversão do promotor para a direção do gene repórter EPIC luc (conjunto de círculos laranja e verdes) acarretando na sua expressão. Fonte: O próprio autor.

Devido a resultados prévios do sistema empregando a T7 RNA polimerase e a diversos imprevistos planejou-se construir este dispositivo com duas unidades de transcrição clonadas em plasmídeos separados, denominados plasmídeo de detecção (contendo o gene da integrase controlado pelo riboregulador e sob o promotor T7) e plasmídeo de resposta (contendo o promotor T7 invertido flanqueado pelos sítios de reconhecimento e o gene da luciferase EPICluc). De certo modo, a separação das unidades de transcrição permite um ajuste mais fino da reação de expressão gênica, uma vez que há a possibilidade de ajustar a quantidade de cada plasmídeo na reação para gerar uma melhor resposta.

Uma abordagem similar, em que o circuito de detecção dividido entre dois plasmídeos, foi realizada por Liu e colaboradores (2020), no qual utilizou-se o regulador transcricional AtzR para a detecção de ácido cianúrico. AtzR é um regulador do tipo LysR responsável pela ativação do operon *atzDEF*, sendo ativado por ácido cianúrico. Uma vez expresso AtzR se liga ao promotor *PatzDEF* ativando a transcrição do gene sob controle do promotor. Empregou-se um plasmídeo para a detecção (expressando AtzR) e outro para a resposta (contendo o operon *atzDEF* e o gene *sfGFP*), nos testes *in vivo* alcançou-se uma taxa de ativação de 4,25 em relação ao controle negativo (sem ácido cianúrico) e nos testes *in vitro* a diferença de amplitude de ativação atingiu um valor 12 vezes maior.

O uso de uma recombinase em um sistema de amplificação tem o potencial não só de amplificar o sinal, mas também de tornar a reação independente da concentração do RNA viral (RNA *trigger*), uma vez que após a concentração da integrase atingir o limiar mínimo para a exibição da atividade invertase ocorre a alteração do estado da expressão do gene repórter de desligado para ligado de forma permanente.

Para a construção do sistema com as integrases 9 e 13, foi primeiramente necessário fazer a otimização de códons do gene destas integrases (a sequência obtida estava com códons otimizados para *A. thaliana*) para a aplicação destas

proteínas em *E. coli*. Para isso, usou-se a plataforma online OPTIMIZER (<http://genomes.urv.cat/OPTIMIZER/>). Nesta ferramenta informou-se a ORF de cada um dos dois genes. Em seguida, se definiu a base de dados de referência HEG-DB (*Highly Expressed Genes Database*) para a análise de códons mais usados e a bactéria *E. coli* como organismo destinatário. Com a tabela de códons mais usados e a sequência inserida o método de otimização “one amino acid - one codon” foi escolhido, neste método códons que codificam o mesmo aminoácido são substituídos pelos códons sinônimos usados com mais frequência no conjunto de referência.

A partir das ORF otimizadas foi desenhado, no software *SerialCloner*, uma sequência sintética de DNA para cada integrase (Int 9 e 13) contendo as duas unidades de transcrição na sequência (Figura 23), organizadas do seguinte modo: o promotor T7 controlando a transcrição do *switch* DENV10550(2) e o gene otimizado da integrase (sem o códon inicial), seguido pelo terminador duplo B0015 (http://parts.igem.org/Part:BBa_B0015), subsequente tem-se o módulo de resposta com promotor T7 invertido flanqueado pelos sítios *attB* e *attP*, o gene da EPICluc com o RBS e o terminador T500 ao fim da sequência.

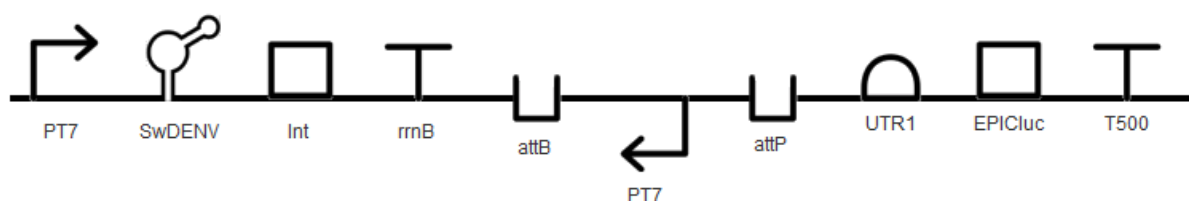


Figura 23 Representação geral do design de uma das sequências sintéticas de DNA para o sistema de amplificação de sinal da integrase desenhado para síntese. Fonte: O próprio autor

Após o design das duas sequências, uma para cada integrase, encomendou-se a síntese em uma empresa especializada em síntese de DNA sintéticos, Epoch Life Science. Após o recebimento de tais sequências notou-se que os plasmídeos sintetizados apresentavam uma luminescência alta (mais de 20 milhões UA de luminescência) na pré-cultura realizada para armazenar estoque dos plasmídeos. Uma vez que o sistema não deveria estar ativo resolveu-se sequenciar tais plasmídeos para checar a porção inicial do módulo de resposta, com isso observou-se que os sítios de reconhecimento já haviam sofrido recombinação, invertendo o promotor T7 na direção do gene repórter e gerando os sítios de recombinação *attL* e

attR. Logo a sequência sintetizada não poderia ser utilizada e a construção foi reiniciada.

Após esse infortúnio, obteve-se o inserto contendo o promotor T7 invertido flanqueado pelos sítios de reconhecimento como duas sequências complementares de oligonucleotídeos, apresentadas na tabela 3 pelos números 431 e 432 para a integrase Bxb1, 453 e 454 para a Int9 e 455 e 456 para a Int13. Estas sequências foram desenhadas com as *overhangs* das enzimas *EcoRI* (na extremidade 5') e *SpeI* (na extremidade 3'), assim não se fez necessária a digestão destas partes para clonagem por meio de *BioBrick assembly* junto ao gene repórter.

A Tabela 14 apresenta as sequências dos sítios de reconhecimentos (*attB* e *attP*) para as integrases empregadas no trabalho.

Tabela 14 Sequências nucleicas dos sítios de reconhecimento das integrases. Fonte: O próprio autor.

		Sequência 5' - 3'
<i>attB</i>	Bxb1	TCGGCCGGCTTGTGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGGGC
	Int 9	TTTATATTGCGAAAAATAATTGGCGAACGAGGTAACCTGGATACCTCATCCGCCAATTAATTTG
	Int 13	GCATACATTGTTGTTGTTTTCCAGATCCAGTTGGTCTGTAAATATAAGCAATCCATGTGAGT
<i>attP</i>	Bxb1	GGGTTTGTACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCACGA
	Int 9	TAATTGGAAGTTCGGAATAACTATGCAGATACCTGATACACACTTCCAACAAAAACAACCAC
	Int 13	TATTCGGAGTTGTATTTATGTTACTAAAACAACCTGGTCAAGTTCTACAAATACAACCGTTATTG

Para a construção do plasmídeo contendo o módulo de resposta introduziu-se primeiramente o inserto contendo apenas um RBS e a ORF da EPICluc no plasmídeo pSB1C3. Este inserto foi gerado por PCR utilizando como molde o plasmídeo pSB1C3_Pt7-EPICluc e os *primers* 397 fw (contendo o *BioBrick* prefixo e sendo complementar ao RBS e a parte inicial do gene da EPICluc) e 256 rv (complementar ao final do gene EPICluc, além de portar o terminador T500 e o *BioBrick* sufixo). O produto purificado da PCR foi digerido e clonado via *BioBrick assembly*, gerando o plasmídeo pSB1C3_RBS-EPICluc. Os oligonucleotídeos complementares contendo o promotor T7 invertido flanqueado pelos sítios de reconhecimentos *attB* e *attP* foram anelados (incubação de 10 mM de cada oligonucleotídeo em 100 µL tampão TE a uma temperatura de 98°C por 10 minutos em banho-seco seguida de resfriamento da mistura até temperatura ambiente) resultando na sequência dupla fita denominada *attB_PT7_attP* a ser utilizada na clonagem. Até o momento da escrita deste texto, no

entanto não se alcançou a introdução da parte *attB_PT7_attP* de nenhuma das integrases, logo não se obteve plasmídeo de resposta para esse sistema de amplificação.

Os dispositivos de detecção foram construídos com as integrases 9 e 13 utilizando os plasmídeos com as sequências sintéticas encomendadas como molde, uma vez que apenas a segunda unidade de transcrição (com o módulo de resposta) estava incorreta. Para tanto, os iniciadores 458 *forward* (que contém o *Biobrick* prefixo e o promotor T7) e 457 *reverse* (que possui a sequência do terminador B0015 (presente no final do gene das integrases) e o *Biobrick* sufixo) foram usados na PCR. Para amplificação do módulo de detecção com a integrase Int9 empregou-se o plasmídeo pSB1C3_Switch2DEN10550_Int9_attB-P_EPICluc como molde e a amplificação do módulo de detecção com a Int13 aplicou-se o plasmídeo pSB1C3_Switch2DEN10550_Int13_attB-P_EPICluc como molde. Os amplicons purificados foram digeridos com as enzimas *XbaI* e *SpeI*, já que a ORF das integrases 9 e 13 continham sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, e clonados no vetor pSB1C3 (também digerido com *XbaI* e *SpeI*), gerando as construções pSB1C3_DENV10550Switch2_Int9 e pSB1C3_DENV10550Switch2_Int13 confirmadas por sequenciamento.

3.10. Análise *in silico*

As sequências do riboregulador DENV10550(2) e a sequência do riboregulador ZIKV1440(2.6) foram avaliadas no software Nupack (ZADEH et al., 2011) e na plataforma de softwares De Novo DNA (ESPAH BORUJENI et al., 2014; 2016; 2017).

No Nupack, analisou-se a estrutura secundária dos *switches* nos estados ON e OFF (DIRKS; PIERCE, 2004), avaliando-se a probabilidade do equilíbrio no pareamento das bases nucleicas (DIRKS et al. 2007) e estabilidade do pareamento na interação em diferentes temperaturas. No software “De Novo DNA” calculou-se, para cada estratégia de amplificação, a força do RBS presente no riboregulador antes e depois da interação deste com o RNA *trigger* cognato de modo a avaliar a taxa de expressão no sistema ativo e inativo.

3.11. Teste de funcionalidade dos sistemas de amplificação de sinal

A funcionalidade dos circuitos sintéticos construídos foi testada contra sequências sintéticas de RNAs correspondentes às sequências *trigger* no desenvolvimento dos *switches*, assim como sequências sintéticas de RNAs de tamanho semelhante não correspondentes/inespecíficas. Sequências sintéticas de DNA (50 nt) correspondentes aos RNAs *trigger* foram construídas sob controle do promotor T7 e obtidas na forma de oligonucleotídeos, sendo posteriormente aneladas, purificadas por precipitação e transcritas em reação *in vitro*.

Por uma questão prática, não foram testados RNAs virais completos, que seriam difíceis de produzir em quantidades adequadas *in vitro*. Foram utilizadas sequências sintéticas de RNA *trigger*, obtidas por meio de um sistema de transcrição com a T7 polimerase. Usar sequências sintéticas curtas é uma boa forma de analisar preliminarmente a resposta dos dispositivos (PARDEE et al., 2014). Embora pequenos RNAs *trigger* sintéticos forneçam uma indicação representativa da função dos sensores a avaliação frente a RNAs virais de amostras biológicas se faz necessário futuramente para observar o efeito de amostras de diferentes matrizes biológicas na funcionalidade do dispositivo. A ativação de expressão gênica geradas por cada RNA *switch* testado com a adição de diferentes quantidades de RNA *trigger* foi medida e comparou-se a diferença de ativação frente a um *trigger* específico e um inespecífico para avaliar a funcionalidade do dispositivo.

3.11.1. Transcrição *in vitro*

As reações de transcrição *in vitro* foram realizadas utilizando a enzima T7 RNA polimerase (Promega). Anteriormente à reação, o DNA molde foi purificado e eluído em água livre de nucleases. A purificação foi feita por precipitação do DNA usando etanol e acetato de sódio 3M (todos os componentes livres de RNase). A reação de transcrição foi montada com descrito na tabela 15 abaixo com um volume final 50 μ L.

Tabela 15 Reação de transcrição *in vitro*. Fonte: O próprio autor.

Componentes	Volume
<i>Transcription optimized 5x Buffer</i>	10 µl
DTT (100mM)	5 µL
rNTPs (2,5 mM/cada)	10 µl
DNA molde linearizado (2-5 µg)	X µl
T7 RNA polimerase	40 U
Água livre de RNase	Completar para 50 µL

A reação foi incubada a 37°C e 300 rpm em termobloco agitado durante a noite. Após, adicionou-se 1 U de RQ1 RNase-free DNase (Promega) por µg de DNA molde aplicado na reação, e esta nova solução foi incubada a 37°C e 300 rpm em termobloco agitado durante 2 horas. O RNA transcrito foi purificado por precipitação usando etanol e acetato de sódio 3M (livres de RNase), eluído em água livre de nuclease e quantificado na leitora de placas Infinite® M200 Pro (Tecan).

3.11.2. Ensaios de expressão *in vitro*

As reações de transcrição e tradução *in vitro* foram realizadas para avaliar a taxa de ativação dos dispositivos regulados pelos *Toehold switches* frente a diferentes tratamentos. Para isso utilizou-se os kits:

- *E. coli* S30 Extract System for Circular DNA (Promega) o plasmídeo empregado deve conter o promotor procariótico apropriado e sítio de ligação ao ribossomo. O extrato S30 para modelos de DNA circular é preparado a partir de uma cepa de *E. coli* B (BL21) deficiente na atividade da endoproteínase OMPT e da protease lon. No extrato, todos os componentes necessários para transcrição e tradução de proteínas são encontrados, com exceção de aminoácidos.
- *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA (Promega) para expressar vetores plasmídiais contendo o promotor T7 como controlador da transcrição da unidade com o gene repórter. Este kit fornece um extrato de *E. coli* BL21 que contém a T7 RNA polimerase para transcrição e todos os componentes necessários para esse processo, assim como para a tradução de proteínas, exceto aminoácidos que devem ser adicionados na montagem da reação.

A deficiência em proteases dos extratos celulares presentes nestes kits comerciais resulta em maior estabilidade de proteínas expressas que, de outra forma, seriam degradadas por proteases se expressas *in vivo*.

O kit a ser empregado depende da construção a ser testada, sendo *E. coli* S30 *Extract System* usado nos testes com o sistema de amplificação da T7 RNA polimerase e o *E. coli* T7 S30 *Extract System* para as demais estratégias. Em cada ensaio as reações foram montadas de acordo com o protocolo do fabricante (Tabela 16). Diferentes tratamentos foram analisados para a mesma construção, sendo assim, um mesmo dispositivo foi utilizado em diferentes reações variando-se apenas o RNA *trigger* aplicado, sendo as condições: RNA *trigger* específico, uma outra utilizando o RNA *trigger* inespecífico e uma reação controle sem *trigger*.

Tabela 16 Reação de transcrição e tradução *in vitro* das construções com *switch*. Fonte: O próprio autor

Componentes	<i>Trigger</i> específico	<i>Trigger</i> inespecífico	Controle (sem <i>trigger</i>)
Plasmídeo	X μ L*	X μ L*	X μ L*
RNA <i>Trigger</i>	Y μ L*	Y μ L*	-
Aminoácidos	1,0 μ L	1,0 μ L	1,0 μ L
S30 p	4,0 μ L	4,0 μ L	4,0 μ L
S30e T7 / S30e Circular	3,0 μ L	3,0 μ L	3,0 μ L
H2O RNase free	Completar p/ 10 μ L	Completar p/ 10 μ L	Completar p/ 10 μ L

* o volume de X e Y variam de acordo com as concentrações de plasmídeo e *trigger* a serem testadas.

As reações foram incubadas a 25°C, 30°C e/ou 37°C durante diferentes intervalos até se padronizar a duração da incubação ideal para cada dispositivo testado. Alíquotas de 2 μ L foram retiradas em intervalos determinados, sendo imediatamente diluídas 10 vezes em BSA 1% (*bovine serum albumine*) afim de interromper a reação da amostra retirada. No ponto final da incubação, o restante da reação também foi diluído 10 vezes em BSA 1% (m/v). As reações do sistema da mf-Lon analisadas por SDS-PAGE não foram diluídas.

De acordo com instruções do fabricante, as reações podem ser realizadas em um volume de até 5 μ L sem que a produção proteica seja afetada, logo o volume final do último ponto das reações nunca foi inferior a esse valor. As alíquotas retiradas durante a incubação permitem acompanhar a progressão da expressão do gene repórter com o tempo.

A leitura da luminescência, para os ensaios do sistema de amplificação da T7 RNA polimerase, foi realizada na leitora de placas Infinite® M200 Pro (Tecan) a uma temperatura de 25°C, em 15 ciclos de 5 segundos de agitação (158,9 rpm). Para a

medição da luminescência adicionou-se em poços individuais de uma placa branca (Costar 96 poços *flat white*) 50,0 µL de substrato (luciferina e ATP) e 10,0 µL do produto da reação diluído com BSA 1%, os picos de luminescência foram anotados, normalizados e comparados entre os tratamentos.

A leitura da fluorescência, para os ensaios do sistema da protease Mf-Lon, foi realizada na leitora de placas a uma temperatura de 37°C, por 24 ciclos, cada ciclo se refere a 5 minutos de agitação (158,9 rpm) e posterior leitura da fluorescência (excitação a um comprimento de onda de 485 nm e medição da emissão a 530 nm), totalizando 2 horas de acompanhamento da fluorescência. Para a medição se ajustou manualmente um ganho (fator de amplificação) em 100 e a *Z-position* para 16640 µm, este último determina a posição vertical em que o detector faz a medição e seu valor varia de acordo com o volume de amostra analisado. Para cada reação adicionou-se, em poços individuais de uma placa branca de fundo branco (Costar 96 poços *flat white*), 100 µL da solução de tampão fostato pH 7 contendo a proteína GFP.pdt#5 para o controle sem reação de expressão gênica; para os tratamentos (sem *trigger*; com *trigger* específico e com *trigger* inespecífico) adicionou-se 90 µL da solução de GFP.pdt#5 e 10 µL do produto da reação diluído com BSA 1%, os picos de fluorescência foram anotados e comparados entre os tratamentos.

3.12. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados utilizou-se os softwares Minitab (versão 19) e Excel 2016. Primeiramente, os resultados dos ensaios de expressão *in vitro* foram tratados, normalizando-se a taxa de expressão, definida pelo nível de luminescência/fluorescência de cada tratamento, pelos valores do controle sem *trigger*. Em seguida, atestou-se a normalidade dos dados pelo Teste de Ryan-Joiner (similar ao teste Shapiro-Wilk), por fim realizou-se a análise de variância das médias individualmente em cada intervalo por meio do ANOVA de fator único ($p < 0,05$) e comparação por teste Tukey ($p < 0,05$).

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise *in silico*

O riborregulador DENV10550(2) e o riborregulador ZIKV1440(2.6), apresentados na tabela 3, foram avaliados nos softwares Nupack e De Novo DNA, empregando também a sequência dos RNAs alvo (tabela 17) nas análises. Na tabela 17 apresenta-se dois RNAs *trigger* de ZIKV (1440 e 9452) pois ambos foram utilizados como *trigger* inespecíficos nas reações com dispositivos empregando o *switch* DENV10550(2).

Tabela 17 Sequência dos RNA alvo complementar ao sítio de ancoragem de cada *Toehold switch*. Fonte: O próprio autor.

RNA <i>trigger</i>	Sequência
ZIKV1440	5' TAATGACACAGGACATGAACTGATGAGAATAGAGCGAAAGTT 3'
DENV10550	5' AAGCTGTACGCATGGGGTAGCAGACTAGCGGTTAGAGGA 3'
ZIKV9452	5' TTCTAGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGA 3'

No Nupack foi prevista a estrutura secundária formada pelo *switch* sozinho e a estrutura deste após hibridização com o RNA alvo específico, nestas conformações avaliou-se a probabilidade do equilíbrio do pareamento das bases nucleicas e estabilidade do pareamento na interação em diferentes temperaturas. Observou-se para o riboregulador DENV10550(2) (Figura 24) e para o ZIKV1440(2.6) (Figura 25) uma energia livre baixa, principalmente no estado *ON* quando o *trigger* está hibridizado, alcançando, respectivamente, - 100,67 kcal/mol e -79,09 kcal/mol, indicando a alta probabilidade de hibridização *switch-trigger* e consequente especificidade do regulador para o RNA alvo. Os valores de energia livre baixos correspondem a uma maior estabilidade da estrutura secundária no equilíbrio, ou seja, um maior número de moléculas vai apresentar tal conformação.

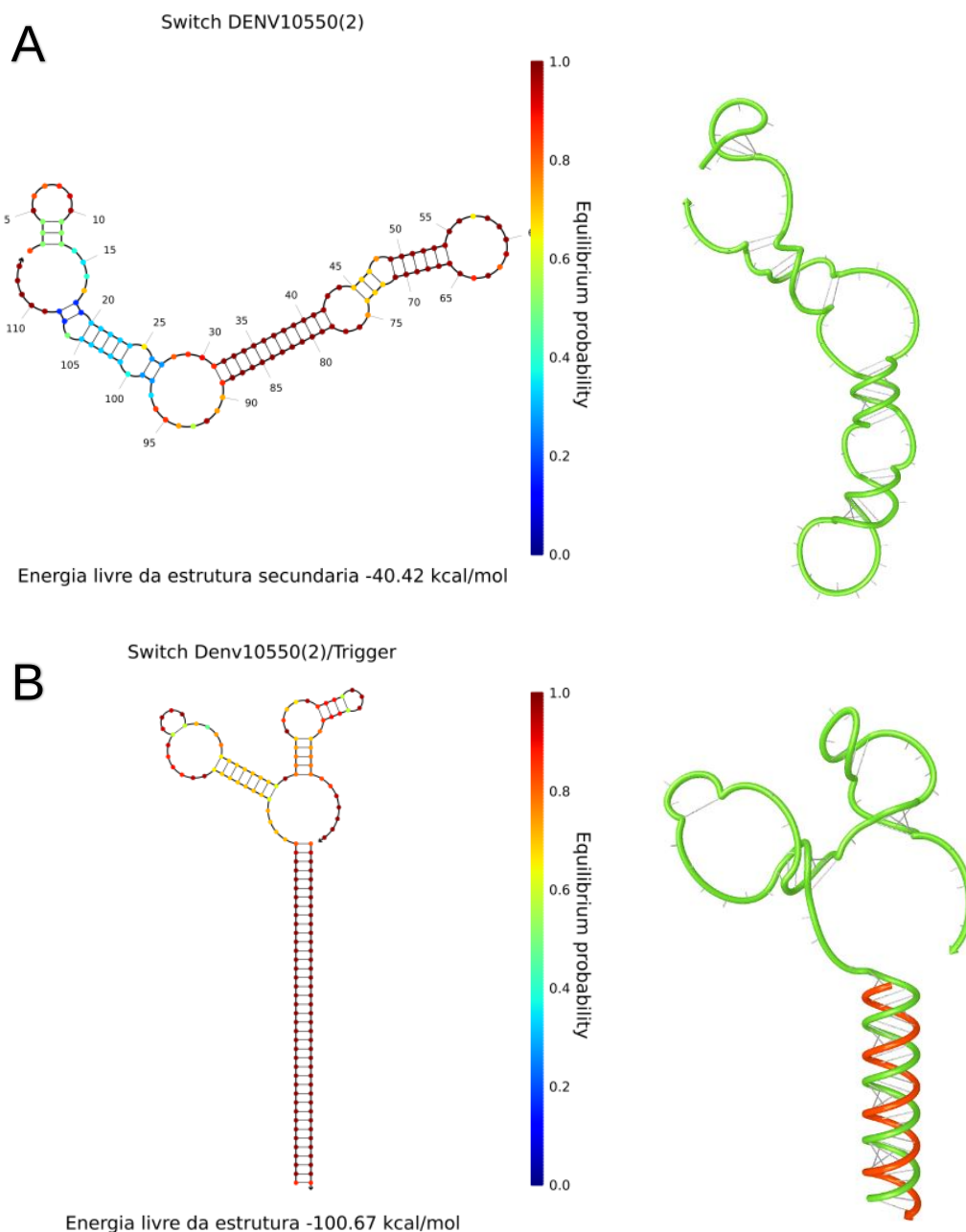


Figura 24 Representação da estrutura secundária do *switch* DENV10550(2) livre (A), referente ao estado OFF, e da estrutura após pareamento com *trigger* específico (B), referente ao estado ON. Pode-se observar a probabilidade do equilíbrio das estruturas secundárias formadas, a taxa do equilíbrio do pareamento é representada pela escala de cor observada na interação de cada base nitrogenada. O RBS está presente no topo do *hairpin*, ribonucleotídeos 55-62, e códon inicial encontra-se em seguida ribonucleotídeos 69-71. Na segunda parte de (B) representa-se o riborregulador em verde e o RNA alvo em vermelho. Fonte: NUPACK.

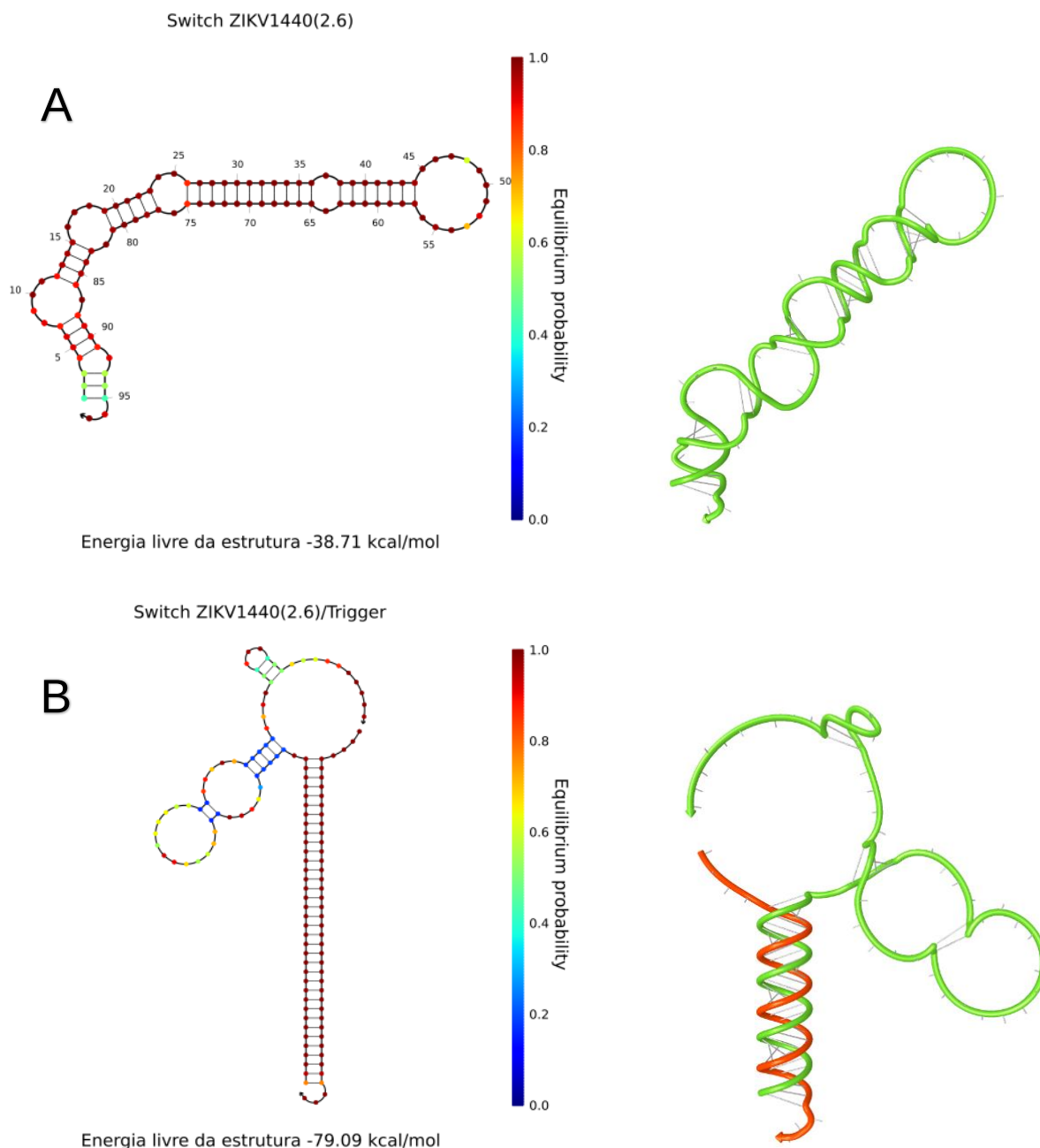


Figura 25 Representação da estrutura secundária do *switch* ZIKV1440(2.6) livre (A), referente ao estado OFF, e da estrutura após pareamento com *trigger* específico (B), referente ao estado ON. Pode-se observar a probabilidade do equilíbrio das estruturas secundárias formadas, a taxa do equilíbrio é representada pela escala de cor observada no pareamento de cada base nitrogenada. O RBS está presente no topo do *hairpin*, ribonucleotídeos 49-55, e códon inicial encontra-se em seguida ribonucleotídeos 62-64. Na segunda parte de (B) representa-se o riboregulador em verde e o RNA alvo em vermelho. Fonte: NUPACK.

Com a alta probabilidade de equilíbrio e energia livre baixa no estado *off*, -40,42 kcal/mol para o *switch* DENV e -38,71 kcal/mol para o regulador ZIKV (Figura 24a e 25a, respectivamente), espera-se que mesmo que um ribossomo consiga se ligar ao

RBS e resolver o arrançamento do *hairpin*, o RNAm possa se rearranjar novamente rapidamente, uma vez que o processo é energeticamente favorável, evitando alto vazamento do circuito pelo *drafting* de ribossomos. Por outro lado, um RBS forte foi escolhido para a sequência dos *switches* para que, após hibridização com o RNA *trigger* específico e resolvido o *hairpin*, a tradução se iniciasse rapidamente.

Pela plataforma de softwares De novo DNA, pode-se calcular a força do RBS em cada uma das construções dos sistemas de amplificação, buscando prever as diferentes taxas de tradução no estado *on* e *off* para cada estratégia. Para isso, no software, introduziu-se a sequência do RNAm referente a sequência completa do *switch* e parte da *ORF* do gene regulado para simular o estado desligado, ou seja, na ausência do RNA alvo cognato. Para simular o estado ligado, adotou-se a parte do *switch* não hibridizada com o *trigger* e o trecho inicial da *ORF* do gene regulado como RNAm de *input* ao software. A inclusão de sequências a jusante e montante do RBS é importante uma vez que estas regiões também influenciam na força de ligação do ribossomo.

Para os sistemas da protease mf-Lon, quando empregado o riboregulador ZIKV o software prevê, no estado *off* uma taxa de tradução de 0,19 UA e energia livre (ΔG) total de 19,46 kcal/mol. Com o sistema ativo a taxa de tradução atinge 6115,47 UA e energia livre total -3,56 kcal/mol. Neste mesmo sistema, mas com o *switch* DENV, no estado desligado é previsto taxa de tradução igual a 4,53 UA e ΔG total de 12,46 kcal/mol. No estado *on* é previsto que esta construção alcance uma taxa de tradução de 2809,79 UA e energia livre total de -1,83 kcal/mol.

Já para os sistemas da T7 RNA polimerase foi previsto uma taxa de tradução igual a 0,19 UA e energia livre total de 19,46 kcal/mol na ausência do *trigger* específico e uma taxa de tradução igual a 6115,47 UA e ΔG total de -3,56 kcal/mol na presença deste para a construção utilizando o riboregulador ZIKV no controle da expressão da enzima T7. Neste mesmo dispositivo biológico com o *switch* DENV a taxa de tradução predita com o sistema desligado é igual a 9,3 UA e energia livre total é de 10,86 kcal/mol, na presença do *trigger* específico a taxa de tradução sobe para 3102,23 UA e a ΔG total é -2,05 kcal/mol.

Para o dispositivo da integrase, calculou-se a força do RBS para cada um dos dois plasmídeos. No plasmídeo de detecção que contém o riboregulador

DENV10550(2), estimou-se a taxa de tradução para o sistema inativado e ativado (presença do RNA específico), respectivamente, 12,68 UA (ΔG total: 10,17 kcal/mol) e 3085,52 UA (energia livre total de -2,04 kcal/mol). No segundo plasmídeo, o de resposta, a tradução não é regulada, apenas a transcrição por meio da orientação do promotor. A taxa de tradução calculada para o códon inicial da luciferase deste inserto é de 25.155 UA, com uma energia livre total de -6,7 kcal/mol, indicando que a tradução desta ORF é altamente favorável, o que geraria uma resposta rápida após a inversão do promotor. A tabela 18 abaixo resume as informações da força prevista para o RBS descrita para cada um dos sistemas de sinalização, ligados e desligados, de modo a facilitar a comparação.

Tabela 18 Cálculo da taxa de tradução e energia livre dos sistemas de sinalização ativos e inativos. Fonte: O próprio autor.

Sistema de sinalização		switch DENV10550(2)		switch ZIKV1440(2.6)	
		OFF	ON	OFF	ON
Mf-Lon	taxa de tradução (UA)	4,53	2809,79	0,19	6115,47
	ΔG (kcal/mol)	12,46	-1,83	19,46	-3,56
T7 RNA polimerase	taxa de tradução (UA)	9,3	3102,23	0,19	6115,47
	ΔG (kcal/mol)	10,86	-2,05	19,46	-3,56
Integrase	taxa de tradução (UA)	12,68	3085,52	-	-
	ΔG (kcal/mol)	10,17	-2,04	-	-

A partir das forças do RBS calculadas e dados energia livre da estrutura secundária, podemos esperar que há uma baixa probabilidade de ocorrer *drafting* de ribossomos no estado *Off* dos sistemas, evidenciado pela baixa taxa de tradução prevista (o maior valor alcançada foi de 4,53 UA no sistema mf-Lon com o riborregulador DENV). Já no estado *On*, nota-se altas taxas de tradução alcançando valores acima de 6000 UA nos sistemas acoplados com o switch ZIKV e valores acima de 2800 UA para os sistemas com o switch DENV, essas altas grandezas indicam um

alto recrutamento de ribossomos e implicam uma tradução rápida e volumosa após a ativação do sistema, além de demonstrarem *in silico* a regulação da expressão dos sistemas propostos.

4.2. Teste de funcionalidade

Apenas os sistemas empregando a T7 RNA polimerase e os sistemas baseados na protease Mf-Lon foram completamente construídos, já o sistema empregando integrase está incompleto, uma vez que os plasmídeos com o módulo de resposta não foram desenvolvidos em tempo hábil.

No decorrer da construção desses dispositivos biológicos outros diversos plasmídeos intermediários (em que apenas um inserto da construção foi adicionado ao vetor, como, por exemplo, o plasmídeo pSB1C3_RBS-EPICluc) foram produzidos. No Apêndice I deste documento encontra-se o resultado do sequenciamento para a confirmação das clonagens dos sistemas de sinalização construídos, assim como de alguns plasmídeos intermediários gerados no processo de clonagem.

4.2.1. Sistema de sinalização baseado na protease Mf-Lon

Primeiramente, para atestar que proteína verde fluorescente havia sido devidamente expressa realizou um ensaio comparando o nível de fluorescência do lisado da cultura utilizada para expressar a proteína, as células *E.coli* BL21 transformadas com o plasmídeo pZE27_GFP.pdt#5, e a mesma linhagem sem o plasmídeo. As amostras das culturas foram diluídas até a mesma DO₆₀₀, para garantir aproximadamente a mesma quantidade de células nos dois tratamentos e em seguida foram lisadas com lisozima. Após o rompimento das células e centrifugação, uma alíquota do sobrenadante resultante foi empregada na medição de fluorescência e o resultado é apresentado na figura 26 abaixo. Pode-se observar uma emissão de luz verde, após excitação, 6,5 vezes maior na linhagem contendo o plasmídeo pZE27_GFP.pdt#5, evidenciando que a proteína GFP fusionada a cauda de degradação #5 foi expressa.

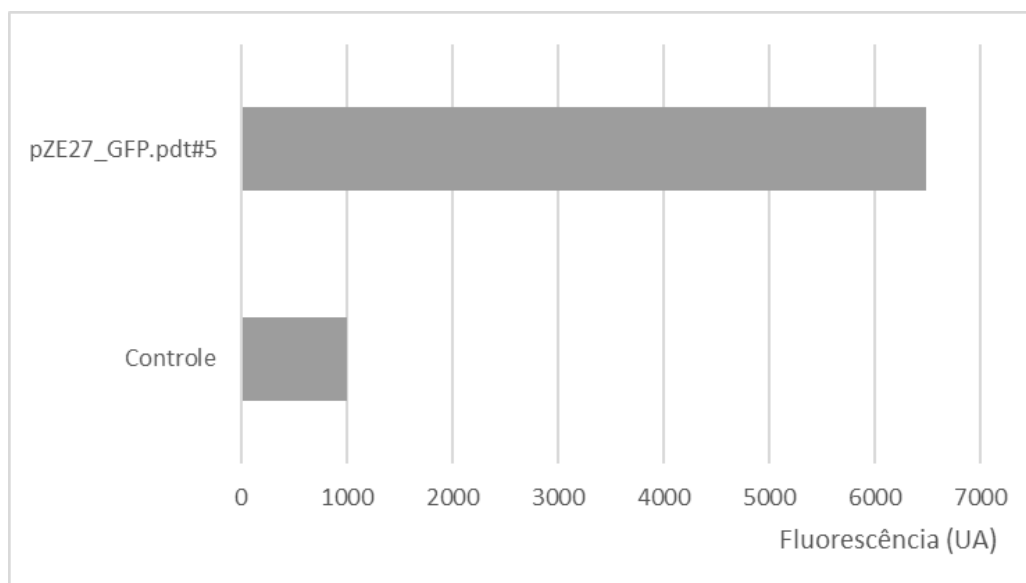


Figura 26 Comparação de nível de fluorescência entre o lisado de uma cultura utilizando células transformadas com o plasmídeo pZE27_GFP.pdt#5 e a mesma linhagem sem plasmídeo (Controle). Para a medição, a concentração de células foi normalizada na mesma O.D para as duas amostras, os valores de fluorescência são apresentados em unidades arbitrárias (UA). Fonte: O próprio autor.

Obtida a proteína GFP.pdt#5, seguiu-se para o teste da funcionalidade das construções dos sistemas de sinalização mf-Lon. Como a resposta positiva deste sistema se baseia na perda da fluorescência, realizou-se testes iniciais de transcrição e tradução *in vitro* durante 4 horas a 37°C, esta incubação longa foi planejada objetivando obter uma alta expressão da protease, para então se realizar a adição do produto da reação na solução salina contendo GFP.pdt#5 e assim computar a variação na fluorescência.

Com o intuito de produzir uma alta quantidade da protease mf-Lon, foi utilizado na reação de expressão *in vitro* 2µg de plasmídeo molde. No primeiro momento não foram adicionados os RNA *trigger* de modo a avaliar o vazamento das construções. As reações de expressão gênica *in vitro* foram realizadas em 3 diferentes tratamentos, em uma se utilizou a construção do sistema com o *switch* DENV, outra para o riboregulador ZIKV e uma terceira condição sem a adição de plasmídeos (utilizada como controle), os ensaios foram realizados apenas em duplicata uma vez que ainda se estava definindo as condições ideais para o teste. Após 4 horas de incubação, as reações *in vitro* foram empregadas no ensaio de degradação da GFP.pdt#5. Avaliou-se a perda de fluorescência desta nova solução durante duas horas, o resultado das médias deste ensaio é apresentado no gráfico abaixo (Figura 27)

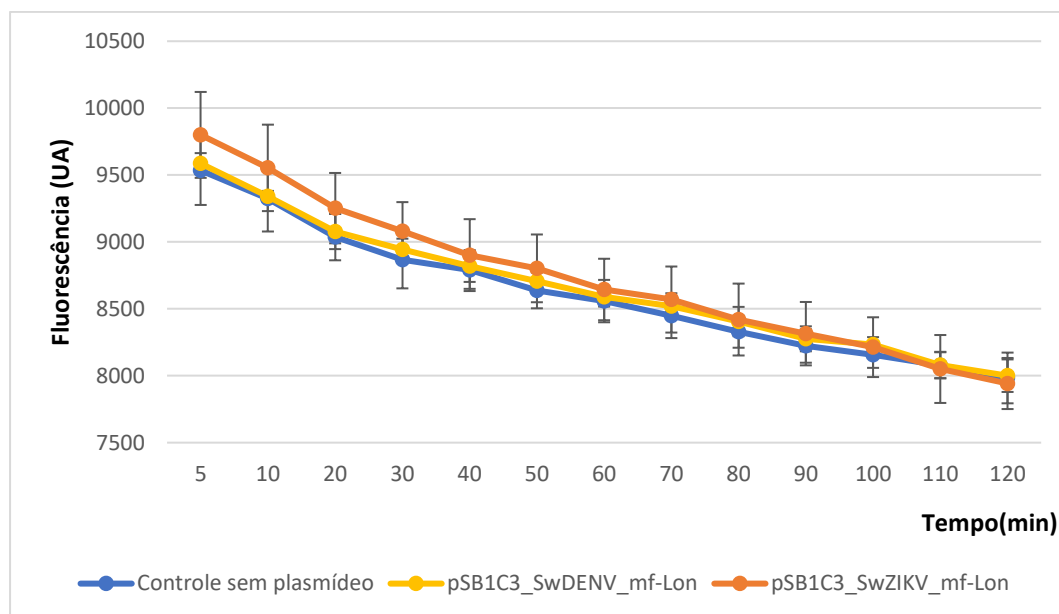


Figura 27 Ensaio de degradação da GFP.pdt#5 pela protease Mf-Lon. Três diferentes condições foram testadas, uma sem plasmídeo (azul), 2 µg de plasmídeo pSB1C3_DENVSw_mf-Lon (amarelo) e 2 µg de plasmídeo pSB1C3_ZIKVSw_mf-Lon (laranja). O resultado da expressão gênica foi aplicado à uma solução salina contendo GFP.pdt#5 e a fluorescência foi medida durante 2 horas em intervalos de 10 minutos. Os valores de fluorescência são apresentados em unidades arbitrárias (UA) e o tempo em minutos (min). Fonte: O próprio autor.

Pode-se observar na figura 27 que há uma baixa taxa de degradação da proteína fluorescente. Mesmo sem a adição do RNA alvo específico para ativação de cada riboregulador, esperava-se uma pequena diminuição da fluorescência devido ao vazamento do dispositivo. Assim, um novo teste foi realizado para verificar o funcionamento da Mf-Lon, utilizando-se um plasmídeo sem a regulação da tradução por riboreguladores. O vetor pSB1C3_Pt7_mf-Lon, em que o gene da protease está apenas sob controle apenas do promotor T7, foi submetido a expressão gênica *in vitro* em duas diferentes quantidades de plasmídeo (600 ng e 1000 ng), novamente a expressão gênica foi realizada durante 4 horas e como anteriormente se avaliou variação da fluorescência com o produto da expressão, porém neste caso durante aproximadamente 1,5 horas. (Figura 28).

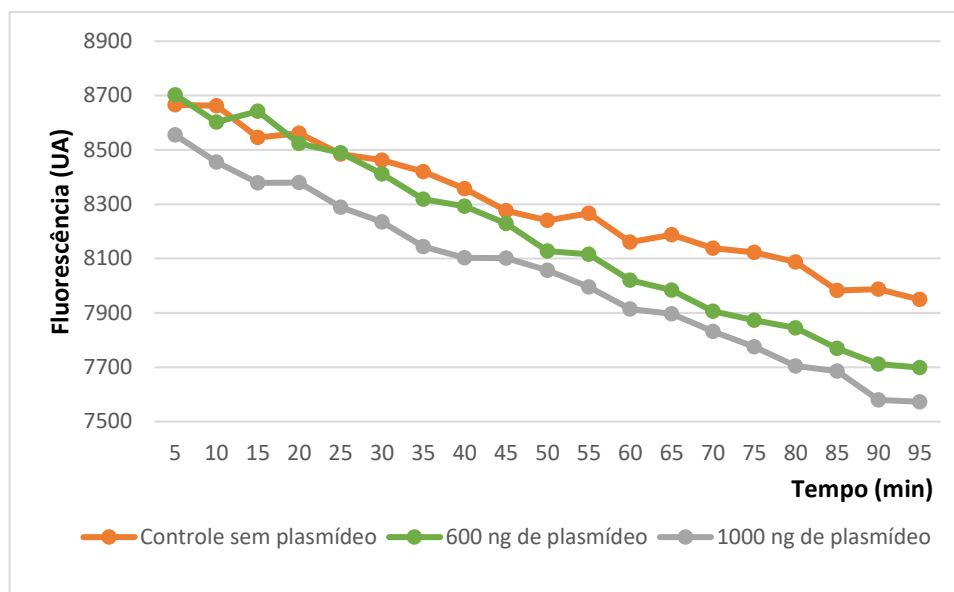


Figura 28 Ensaio de avaliação da protease Mf-Lon. Neste teste a expressão *in vitro* da protease não sofria regulação de um riborregulador. Três diferentes tratamentos foram realizados na expressão gênica *in vitro* utilizando o plasmídeo pSB1C3_Pt7_mf-Lon, foram eles: controle sem plasmídeo (laranja), 600 ng de plasmídeo (verde) e 1000 ng de plasmídeo (cinza). O resultado da expressão gênica *in vitro* foi aplicado à uma solução contendo GFP.pdt#5 e a fluorescência foi medida durante 95 minutos em intervalos de 5 minutos. Os valores de fluorescência são apresentados em unidades arbitrárias (UA) e o tempo em minutos (min). Fonte: O próprio autor.

Contudo não se observou uma redução significativa na fluorescência no período analisado, nota-se uma redução de 8,27% na reação controle, uma diminuição em 11,53% da fluorescência na reação com 600 ng de plasmídeo e uma atenuação de 11,47% na reação com 1000 ng de plasmídeo. Segundo informações da literatura, esta Lon protease *in vivo* degrada 50% das proteínas fluorescente com a cauda pdt#5 uma hora e meia após a indução de sua expressão, resulta em 90% de degradação com 3 horas e alcança quase 100% de degradação 4 horas após a indução (CAMERON; COLLINS, 2014). Uma vez que a expressão gênica *in vitro* da protease foi realizada durante 4 horas, previamente ao ensaio de degradação da GFP, o decrescimento da fluorescência observado foi muito baixo, ainda mais se levarmos em conta o *quenching* da GFP devido aos ciclos de excitação a cada 5 minutos durante a 1,5 de reação de leitura da fluorescência.

Realizou-se um SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil-sulfato de sódio) 12% para verificar a expressão da mf-Lon nos ensaios *in vitro*. Para tanto, dois novos ensaios de expressão gênica foram realizados, um controle sem adição de plasmídeo e um com o plasmídeo pSB1C3_PT7_mf-lon como molde para

produção da protease. Após incubação de 4 horas, as reações de transcrição e tradução *in vitro* foram submetidas a SDS-PAGE e o gel resultante da corrida é apresentado na figura 29. A massa molecular da mf-Lon é de 89,28 kDa, esperava-se um gel com muitas bandas uma vez que um dos componentes do kit de expressão *in vitro* é um extrato celular, no entanto após 4 horas de expressão gênica *in vitro* esperava-se encontrar um banda proeminente na faixa de 89 kDa na reação com molde em comparação com o poço da reação controle, o que indicaria a expressão da proteína desejada. A expressão da proteína era esperada uma vez que o sequenciamento do plasmídeo (Apêndice I, figura A2) não apresenta nenhum erro na sequência do promotor, RBS ou na sequência inicial e final do gene *mf-lon*.

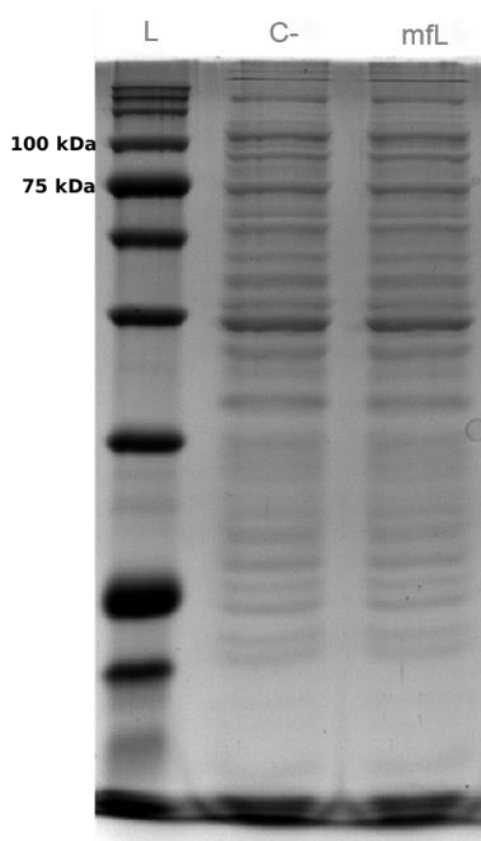


Figura 29 SDS-PAGE dos ensaios *in vitro* da protease mf-Lon. (L) marcador de massa molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo) 10-180 kDa; (C-) reação de expressão gênica *in vitro* controle sem plasmídeo; (mfL) reação de expressão gênica *in vitro* da protease mf-Lon, 100 ng do plasmídeo pSB1C3_PT7_mf-lon foi utilizado como molde nesta reação. São destacadas as bandas de 100 e 75 kDa, a massa molecular da mf-Lon é de aproximadamente 89 kDa. Fonte: O próprio autor.

Não se observou a banda proeminente esperada, algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar tal resultado como, por exemplo, o período de incubação da reação de expressão gênica ou da reação de degradação do fluoróforo deve ser

maior para observar a ação da protease (esta alternativa iria contra um dos objetivos do trabalho, que é a rapidez do teste), expressão muito baixa da mf-Lon ou expressão em uma forma não ativa *in vitro*. A busca de artigos citando o uso desta Lon protease *in vitro* no banco de dados NCBI usando as tags “(mf-lon) AND (*in vitro*)” e “(*Mesoplasma florum* Lon protease) AND (*in vitro*)” não retornam resultado. No entanto, há artigos citando o uso desta enzima no design de circuitos sintéticos empregados em células microbianas (HUANG et al., 2012; MAIER et al. 2017; CAMERON; COLLINS, 2017). Este fato apenas não é suficiente para se afirmar que tal protease não funciona em um ambiente *cell-free*, mas corrobora para esta hipótese.

A partir de tais resultados, seguiu-se para a construção das demais estratégias de sistemas de amplificação de sinal e devido à falta de tempo não se investigou mais a fundo a razão pela qual a protease não foi funcional *in vitro*. As etapas a serem investigadas seriam se há um problema com a transcrição do gene, que poderia ser analisado por meio de uma qPCR, ou se o problema é na tradução da proteína, para isso um método mais específico que SDS-PAGE para detecção da proteína poderia ser utilizado, como o Western Blot.

4.2.2. Sistema de amplificação de sinal baseado na T7RNApol

Na avaliação dos sistemas empregando a T7 RNA polimerase, primeiramente foram realizados diversos ensaios de transcrição e tradução *in vitro* com o objetivo de definir as condições padrão para os testes seguintes. Para tanto, realizou-se reações sem a adição de RNA *trigger*, apenas variando a quantidade de DNA plasmidial (pSB1C3_SwitchDENV10550(2)_T7RNApol_EPICluc ou pSB1C3_SwitchZIKV1440(2.6)_T7RNApol_EPICluc) em cada reação a fim de avaliar o vazamento dos sistemas, isto é a produção de luminescência sem introdução do RNA *trigger* para “ativar” a tradução do gene da T7 RNA polimerase, e assim encontrar uma concentração ideal de DNA, que apresentasse, no estado *off*, uma luminescência inferior a 800 UA. Ao fim, definiu-se a utilização de 100 ng de plasmídeo pSB1C3_SwitchDENV10550(2)_T7RNApol_EPICluc e 75 ng para o plasmídeo empregando o *switch* ZIKV1440(2.6) por reação.

Os sistemas foram caracterizados por meio de reações de transcrição e tradução *in vitro* seguidas de reações de luminescência para avaliar a resposta do gene repórter. As unidades de transcrição foram identificadas como módulo de

detecção (apresentando o *Toehold switch*, DENV10550 ou ZIKV1440, clonado entre o promotor PJ23119 e o gene da T7 RNA polimerase) e módulo de resposta (com o gene repórter EPICluc sob controle do promotor T7). A partir dos resultados de luminescência analisou-se a taxa de expressão do gene repórter submetido a diferentes tratamentos, sendo eles: presença de *trigger* específico, presença de *trigger* inespecífico e ausência de qualquer *trigger*. As análises nestas condições buscam observar o efeito da riboregulação dos *switches* nas construções na presença e ausência do RNA alvo. Para facilitar o entendimento separou-se os resultados de acordo com o riboregulador utilizado para detecção.

Riboregulador DENV10550(2)

As reações de expressão gênica com o sistema de amplificação da T7 RNA pol com o *switch* DENV10550(2) foram realizadas em três temperaturas (25°C, 30°C e 37°C). Nos ensaios com o dispositivo em plasmídeo único adicionou-se 100 ng do vetor por reação. Já para o sistema em dois plasmídeos (nomeado T7RNApol 2p), duas diferentes razões entre plasmídeo de detecção e plasmídeo de resposta foram avaliadas, sendo elas 5:1 e 1:10 (detecção:resposta), sendo aplicados, respectivamente 50 ng do dispositivo de detecção e 10 ng do dispositivo de resposta (nomeados ensaios T7RNApol 2p 50:10), e 10 ng do plasmídeo de detecção e 100 ng do plasmídeo de resposta (ensaios T7RNApol 2p 10:100). Em cada replicata, os 3 tratamentos (controle sem *trigger*; *trigger* específico e *trigger* inespecífico) foram executados, este fato é importante pois as reações são sensíveis e realizadas em um volume muito pequeno (10 µL), sendo necessário realizar as reações controle simultaneamente para cada repetição. Os valores brutos de luminescência gerados foram normalizados pelos dados do controle sem *trigger* de cada replicata, as médias e desvio padrão das repetições foram calculadas a partir dos dados normalizados.

São apresentados na figura 30 abaixo os resultados do ensaio de expressão gênica do sistema em plasmídeo único realizados a 30°C, adicionou-se 500 ng de *trigger* específico ou inespecífico como tratamento. Dois intervalos de incubação foram avaliados, 10 e 20 minutos, para se encontrar o tempo ideal que resulta a maior amplitude de expressão gênica entre o *trigger* específico e o inespecífico.

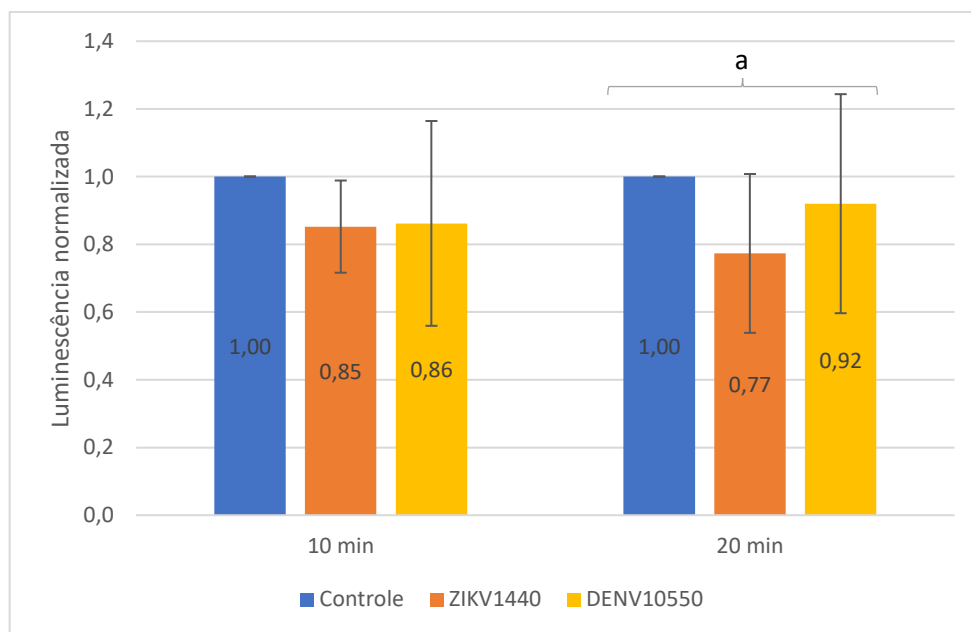


Figura 30 Taxa de ativação gênica do sistema de amplificação T7 com o *switch* DENV10550(2) com reação incubada a 30°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica realizados em triplicata complementados com 500 ng de *trigger* específico DENV10550 (amarelo), com 500 ng de *trigger* inespecífico ZIKV1440 (laranja), e reação controle sem RNA *trigger* (azul). Os valores de luminescência foram normalizados pelo controle, o tempo está expresso em minutos (min). Análise de variância ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação por teste de Tukey (valor $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor.

Embora tenha-se observado uma amplitude de ativação 19% maior para a reação com o RNA alvo específico aos 20 minutos quando comparada com a resposta da reação com *trigger* inespecífico no mesmo intervalo, não se constata uma variação da expressão do gene repórter significativa entre os tratamentos, análise por ANOVA (valor de $p < 0,05$) resulta em um valor de $p = 0,348$. Entre as replicatas deste teste, principalmente das reações com RNA específico (DENV10550), houve grande variação da resposta gerando desvios padrão altos e se observa uma amplitude de ativação com o *trigger* DENV10550 quase similar, em média, aos 10 minutos de reação. A partir deste resultado realizou-se novas reações, porém incubadas a 37°C, para avaliar se o aumento da temperatura afetaria o padrão de resultado alcançado nas reações incubadas a 30°C.

Nos ensaios incubados a 37°C, três intervalos de incubação foram analisados, 5, 10 e 20 minutos. No entanto, não houve mudança no padrão de resposta gerado (Figura 31), ou seja, ainda não se observou especificidade do dispositivo para os diferentes RNA *triggers* aplicados.

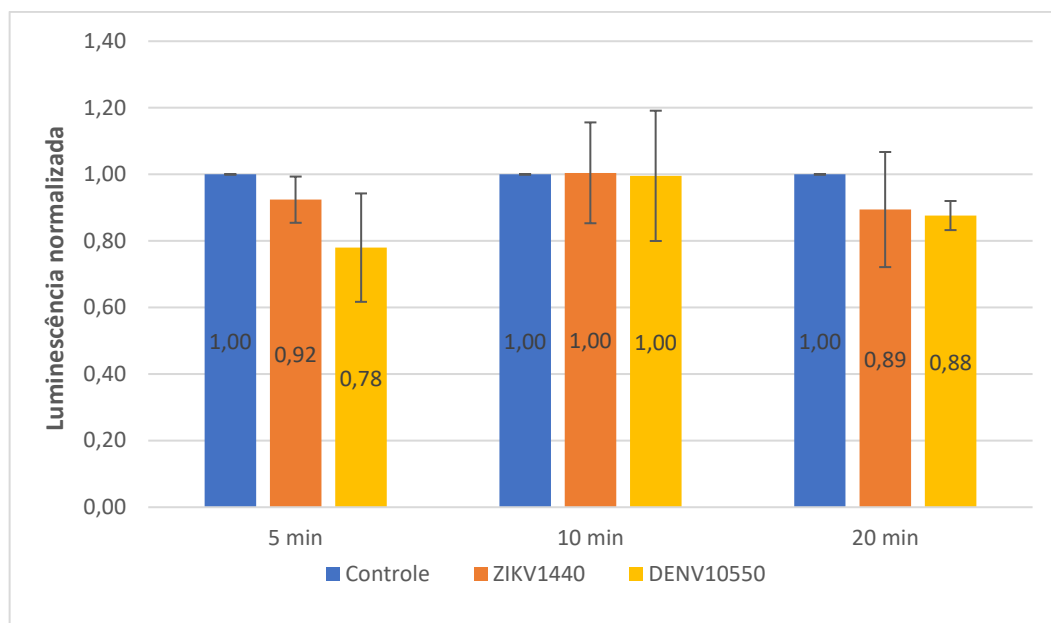


Figura 31 Taxa de ativação gênica do gene repórter no sistema de amplificação T7 com o *switch* DENV10550(2) com reação incubada a 37°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica realizados complementados com 500 ng de *trigger* específico DENV10550 (amarelo), ou com 500 ng de *trigger* inespecífico (laranja), e sem RNA *trigger*, controle (azul). Os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*, o tempo está expresso em minutos (min). Fonte: O próprio autor.

Os resultados dos testes para esse sistema não exibiram seletividade para os RNAs alvo específicos, tais resultados devem ser decorrentes do vazamento do sistema. O promotor J23119 utilizado no módulo de detecção é um promotor forte de *E. coli* como publicado no website do “Registry of Standard Biological Parts” (http://parts.igem.org/Part:BBa_J23119), sendo também caracterizado como forte em cianobactéria (MARKLEY et al., 2015). Este promotor leva a uma alta transcrição da primeira unidade e consequente aumento do vazamento da expressão da polimerase. Na reação de expressão gênica *in vitro*, uma vez que a T7 RNA polimerase é traduzida, esta começa a atuar no promotor T7 gerando a resposta do sistema. Logo, o vazamento da polimerase pode nivelar os níveis de expressão do gene repórter entre os tratamentos. Desse modo, avaliou-se reduzir a temperatura em que as reações com plasmídeo único são incubadas para 25°C, visando diminuir a atividade da T7 RNA polimerase.

Nas reações a 25°C como nos ensaios anteriores avaliou-se a resposta aos 5, 10 e 20 minutos de incubação e empregando, no entanto, 1000 ng de RNA *trigger*. Os níveis de luminescência gerada aos 5 minutos para todos os tratamentos foram baixos, não sendo possível diferenciar do *background* da reação de luminescência,

assim analisou-se apenas as médias com 10 e 20 minutos (Figura 32), nessa nova condição de temperatura pode-se notar uma resposta positiva mesmo que inferior ao esperado, apresentando uma amplitude de resposta para o RNA específico 36% maior aos 10 minutos e 30% maior aos 20 minutos.

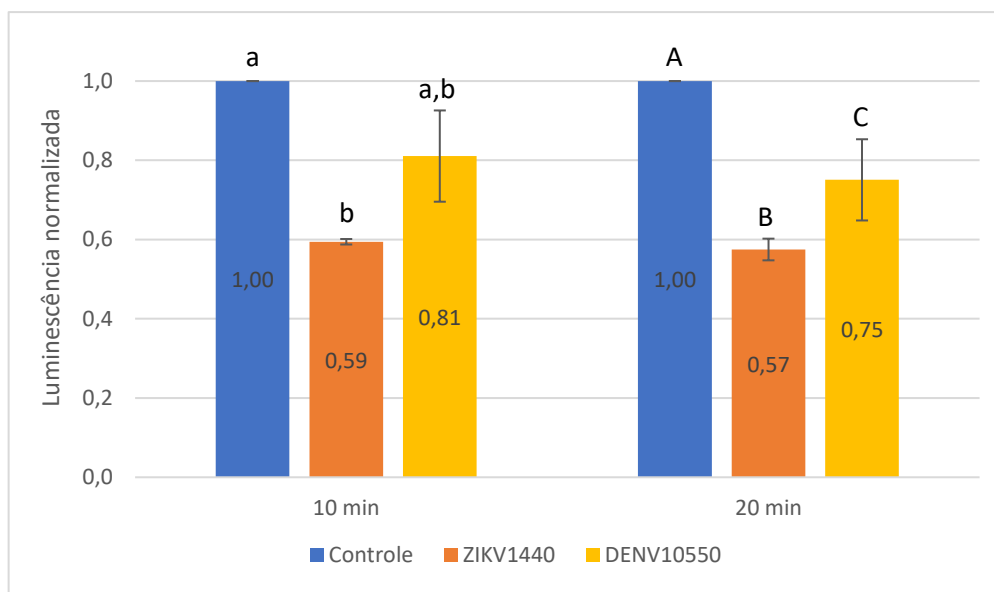


Figura 32 Gráfico das médias de luminescência do ensaio de expressão gênica com o sistema T7RNApol com o *switch* DENV10550(2) incubada a 25°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica complementados com 1000 ng de *trigger* inespecífico ZIKV1440 (laranja), 1000 ng de *trigger* específico DENV10550 (amarelo), e sem RNA *trigger*, controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*, o tempo está expresso em minutos (min). Análise de variância ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação por teste de Tukey (95% de confiança) foram avaliados individualmente para cada intervalo de tempo. Fonte: O próprio autor.

Análise ANOVA fator único (valor $p < 0,05$) mostrou variância significativa na ativação do dispositivo entre os *triggers* DENV10550 e ZIKV1440 (Figura 33) aos 20 minutos de reação.

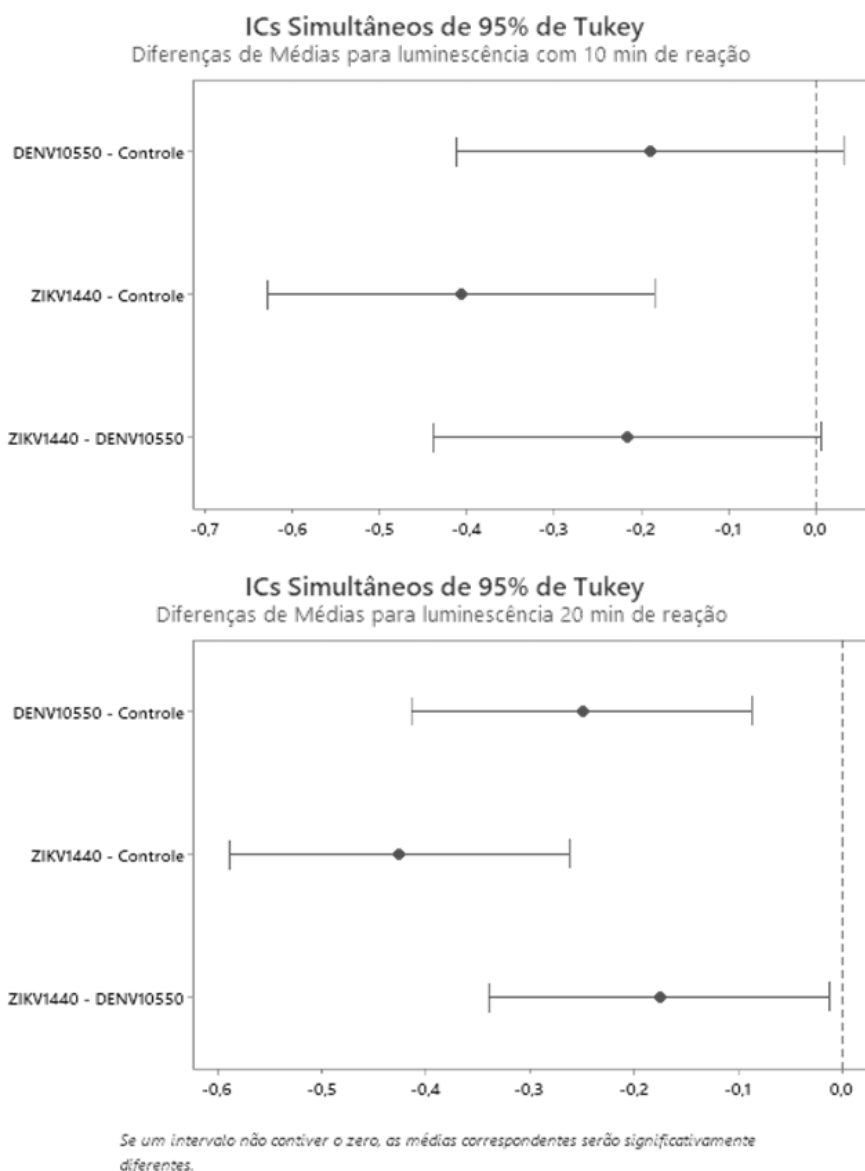


Figura 33 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7 RNA pol com o *switch* DENV10550(2) incubado a 25°C empregando 1000 ng de *trigger*. Intervalo de confiança de 95%. Aos 10 minutos de incubação não há diferença significativa entre as médias de luminescência entre DENV10550 e ZIKV1440 (gráfico superior). Já aos 20 minutos a taxa de ativação do sistema quando adicionado o RNA alvo específico é significativamente diferente de quando se adiciona o *trigger* inespecífico (gráfico inferior). Fonte: O próprio autor.

Divisão dos módulos do sistema em dois plasmídeos

Com a alta eficiência da T7 RNA polimerase e pelos resultados do sistema em plasmídeo único, ponderou-se separar o sistema em dois plasmídeos, cada um contendo uma das unidades de transcrição, podendo assim controlar melhor a proporção dos módulos do dispositivo.

Nesta tentativa de aprimorar a resposta realizou-se ensaios com o sistema T7RNApol 2p 50:10 (vetor de detecção: vetor de resposta), esta proporção foi obtida após reações controle testando diferentes quantidades de cada plasmídeo até se alcançar uma resposta dentro do limite definido (luminescência no estado *off* inferior a 800 UA e superior a 100 UA). Assim como para o teste a 25°C, os níveis de luminescência gerados aos 5 minutos foram similares ao *background*, indicando que a expressão gênica *in vitro* não atingiu níveis mínimos para resposta. Já para os resultados com 10 e 20 minutos, como pode ser observado na figura 34, obteve-se uma resposta menos específica em relação às reações realizadas com o sistema em plasmídeo único. Os ensaios com T7RNApol 2p 50:10 apresentaram uma expressão do gene repórter similar entre os tratamentos aos 10 minutos, porém uma amplitude de resposta aproximadamente 32% menor aos 20 minutos de incubação para a reação com *trigger* DENV10550.

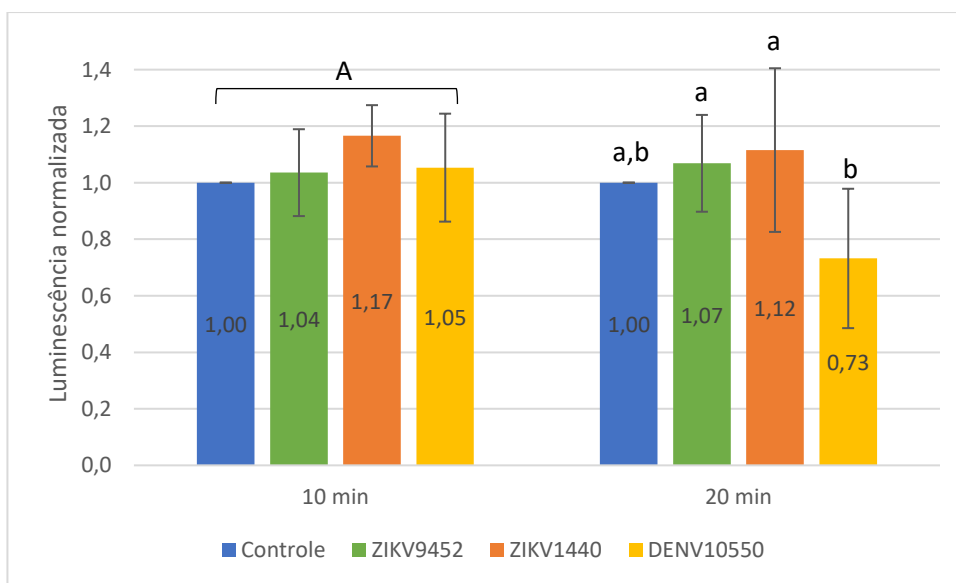


Figura 34 Luminescência média do ensaio de expressão gênica com o sistema de amplificação da T7RNApol 2p 50:10 com o *switch* DENV10550(2) incubada a 30°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica complementados com 500 ng de *trigger* inespecífico, definido pelos *triggers* ZIKV1440 (laranja) e ZIKV9452 (verde), ou com 500 ng de *trigger* específico, definido como DENV10550 (amarelo), e sem RNA *trigger*, controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*, o tempo está expresso em minutos (min). Análise de variância ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação por teste de Tukey (valor $p < 0,05$) foram avaliados individualmente para cada intervalo de tempo. Fonte: O próprio autor

Após observado o resultado do sistema acima realizou-se novos ensaios utilizando a proporção de 10:100 (módulo de detecção: módulo de resposta), o sistema nestas condições foi nomeado T7RNApol 2p 10:100. Assim como anteriormente estas

proporções foram obtidas após reações controle avaliando diferentes quantidades de cada plasmídeo. Computou-se a resposta com 10, 20 e 30 min de incubação, uma vez que ensaios iniciais com 5 minutos de reação não atingiram níveis mínimos para resposta.

Os resultados do sistema T7RNAPol 2p 10:100, aplicando 500 ng de RNA *trigger*, são exibidos figura 35 e nota-se uma amplitude de ativação crescente com o tempo na reação *in vitro* com o RNA alvo específico. Os ensaios apresentaram uma ativação da expressão do gene repórter 1,22 vezes maior aos 10 minutos, aumentando para 1,71 vezes aos 20 minutos e alcançando a maior resposta aos 30 minutos com uma amplitude 2,29 vezes superior para a reação com *trigger* DENV10550 quando comparado com o *trigger* inespecífico ZIKV9452. A análise da variância (ANOVA fator único, valor $p < 0,05$) mostrou variância significativa entre os tratamentos dos ensaios, utilizou-se então do teste de Tukey para definir quais tratamentos diferiram entre si e confirmou-se a ativação diferencial do dispositivo entre os *triggers* DENV10550 e ZIKV9452 (Figura 36).

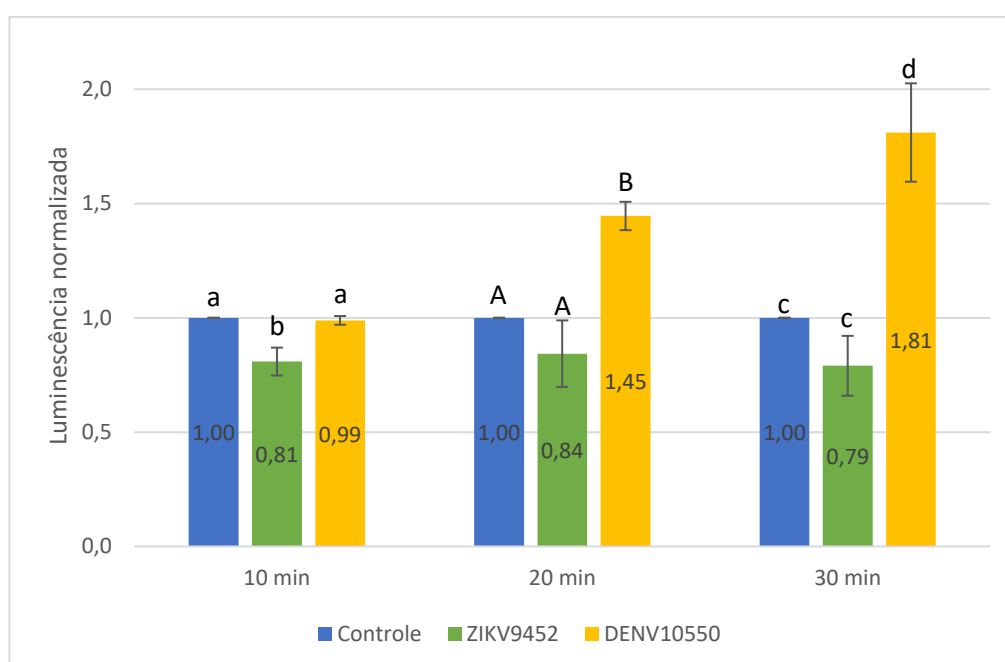


Figura 35 Amplitude de expressão do sistema T7RNAPol 2p 10:100 com o *switch* DENV10550(2) empregando 500 ng de *trigger* e de incubação curta. Reação incubada a 30°C, dados normalizados pelo controle. Ensaios de expressão gênica realizados com adição de 500 ng de *trigger* inespecífico ou ZIKV9452 (em verde) e específico ou DENV10550 (amarelo). O controle (azul) se refere à reação sem adição de RNA *trigger*. Aos 10 minutos, a amplitude de ativação foi 1,22 maior na reação com RNA alvo cognato ao riboregulador, aumentando para 1,17 aos 20 minutos e atingindo uma expressão gênica 2,29 vezes maior em relação à reação com RNA ZIKV9452 aos 30 minutos. O cálculo da diferença estatística (feito por

ANOVA (valor $p < 0,05$), comparação por teste de Tukey) foram realizados individualmente para cada intervalo. Fonte: O próprio autor

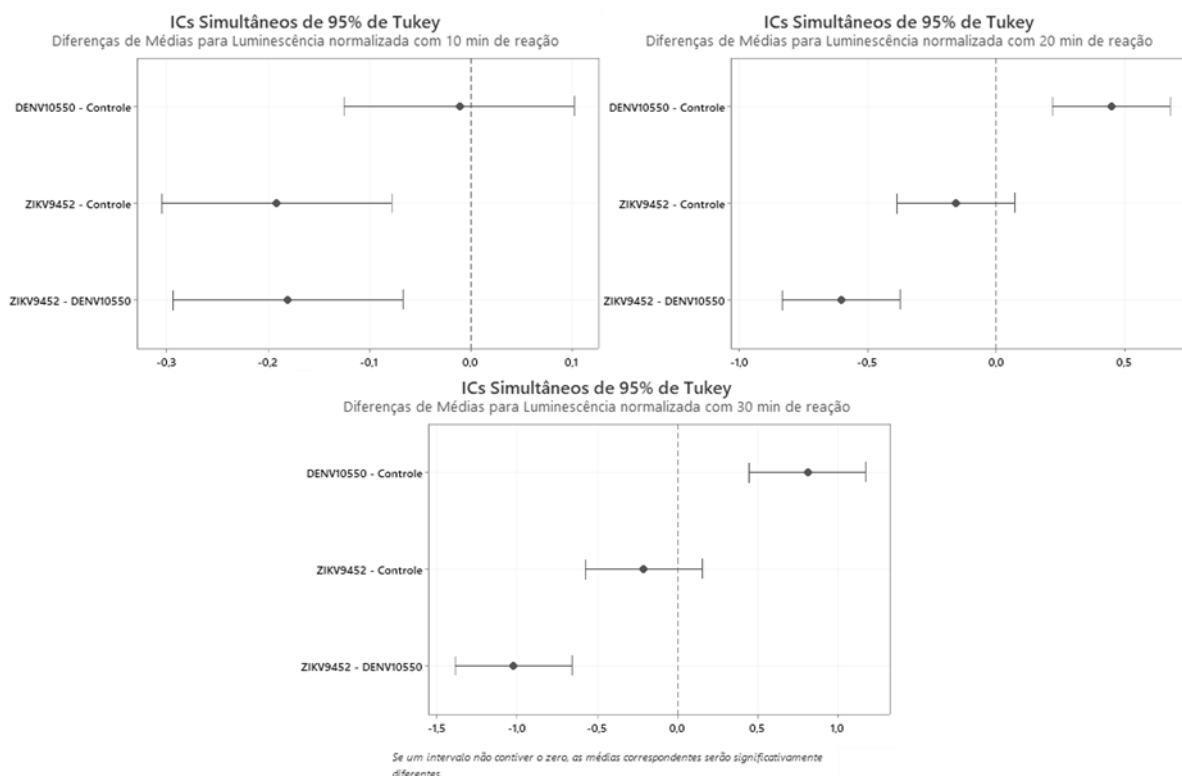


Figura 36 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7RNApol 2p 10:100 com o *switch* DENV10550(2) a 30°C de incubação curta e empregando 500 ng de *trigger*. Intervalo de confiança de 95%. Constata-se diferença significativa entre as médias de luminescência entre DENV10550 e ZIKV9452 em todos os intervalos (10 min, 20 min e 30 min). Fonte: O próprio autor.

Após verificação da amplitude de ativação crescente no ensaio anterior, realizou-se um novo teste com maior tempo de incubação a fim de verificar se a amplitude continuaria aumentando. As reações foram realizadas com 1 e 2 horas de expressão gênica *in vitro*. O gráfico abaixo (Figura 37) retrata os resultados obtidos. Com 1 hora de reação, a amplitude de ativação foi 1,64 vezes maior na reação com RNA alvo específico, aumentando para 2,10 vezes com 2 horas de incubação quando comparado a reação com RNA inespecífico. A análise da variância (ANOVA fator único, valor $p < 0,05$) e teste de Tukey (valor $p < 0,05$) evidenciaram a ativação diferencial do dispositivo entre os *triggers* DENV10550 e ZIKV9452 (Figura 38).

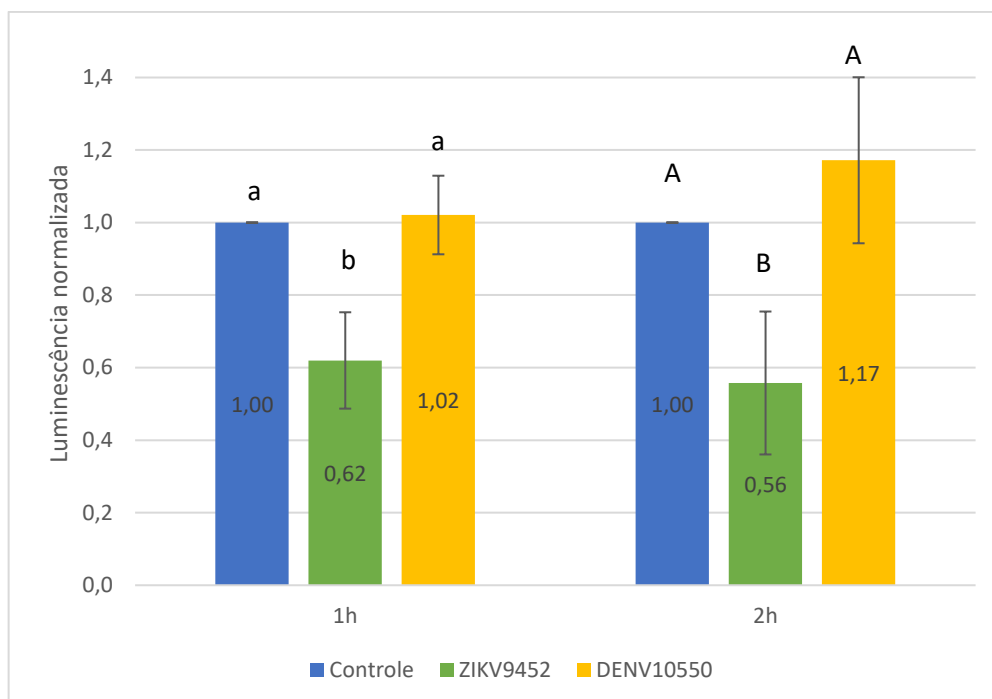


Figura 37 Amplitude de expressão do sistema T7RNAPol 2p 10:100 com o *switch* DENV10550(2) empregando 500 ng de *trigger* e de incubação longa. Reação incubada a 30°C, dados normalizados pelo controle. Ensaios de expressão gênica realizados com adição de 500 ng de *trigger* inespecífico ZIKV9452 (em laranja) e específico DENV10550 (amarelo). O controle (azul) se refere à reação sem adição de RNA *trigger*. Com 1 hora de reação a amplitude de ativação foi 1,64 vezes maior na reação com RNA alvo cognato ao riboregulador, aumentando para 2,10 com 2 horas de incubação quando comparado a reação com RNA ZIKV9452. O cálculo da diferença estatística por ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação da diferença média por teste de Tukey (valor $p < 0,05$) foram avaliados individualmente para cada intervalo. Fonte: O próprio autor.

Verificou-se que uma reação relativamente curta (30 min) já apresenta a maior taxa de ativação do sistema, o que favorece um dos objetivos do trabalho de se desenvolver uma tecnologia que possa ser aplicada em um teste rápido. Este tempo de reação é inferior principalmente em comparação com as tecnologias recentes de detecção molecular (SHERLOCK e *Toehold switch* padrão), que levam horas para gerar a resposta, mas infelizmente não apresenta uma amplitude de ativação suficientemente alta.

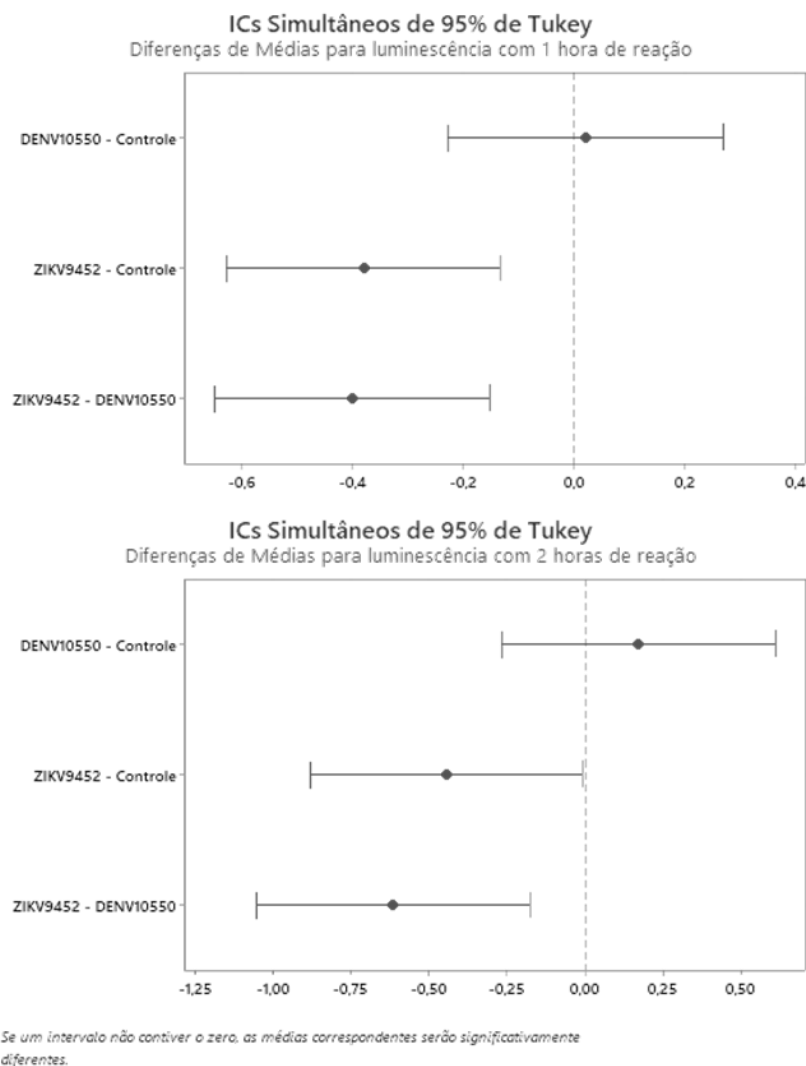


Figura 38 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7RNAPol 2p (10-100) com o switch DENV10550(2) a 30°C e de incubação longa e empregando 500 ng de trigger. Intervalo de confiança de 95%. Constata-se diferença significativa entre as médias de luminescência entre DENV10550 e ZIKV9452 nos dois intervalos avaliados (1 e 2 horas). Fonte: O próprio autor.

Riboregulador ZIKV1440(2.6)

As reações de expressão gênica com o sistema de amplificação da T7 RNA pol com o *switch* ZIKV1440(2.6) foram utilizados 75 ng de plasmídeo nas reações com a construção em um único vetor. Nas reações com o dispositivo em dois vetores duas razões entre plasmídeo de detecção e plasmídeo de resposta foram avaliadas, a proporção entre os dois plasmídeos foi a mesma que citada para o dispositivo com *switch* DENV10550(2), ou seja, ensaios com 50 ng do dispositivo de detecção e 10 ng do dispositivo de resposta (nomeados T7RNAPol 2p 50:10) e experimentos de expressão gênica com 10 ng do plasmídeo de detecção e 100 ng do plasmídeo de resposta (T7RNAPol 2p 10:100). Os 3 tratamentos (sem *trigger*; com *trigger* específico

e com *trigger* inespecífico) foram executados em cada replicata e os valores brutos de luminescência gerados foram normalizados pelos dados do controle sem *trigger*, as médias e desvio padrão foram calculadas a partir dos dados normalizados.

A figura 39 apresenta os resultados das reações de funcionalidade realizadas com o dispositivo plasmídeo único a 37°C complementadas com 500 ng de RNA *trigger*. Observa-se que, assim como para o sistema empregando o outro *switch*, os resultados gerados nos ensaios de transcrição e tradução *in vitro* não mostraram variação entre as médias dos tratamentos nos diferentes tempos de incubação (5, 10 e 20 minutos).

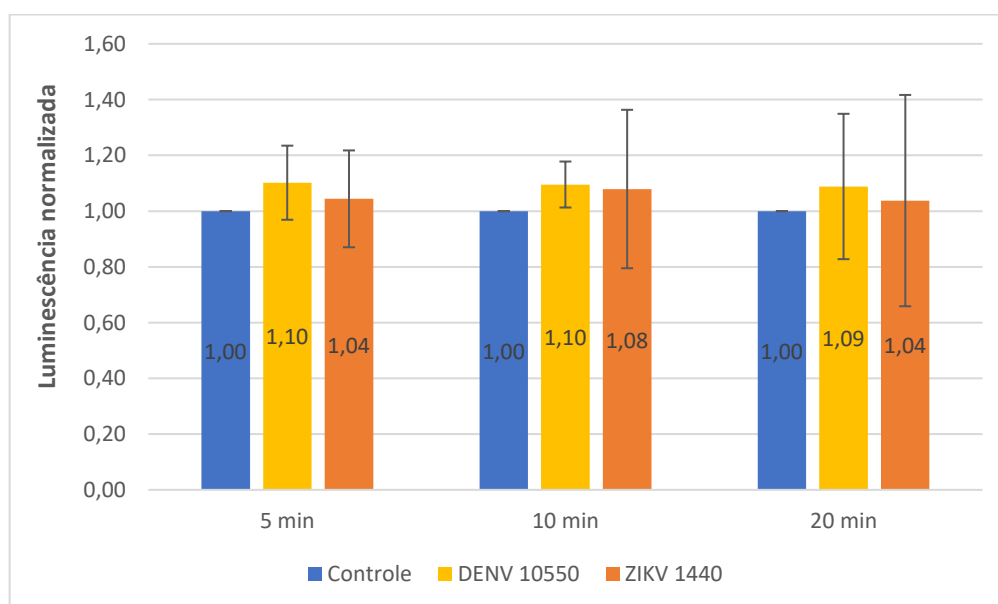


Figura 39 Médias de luminescência do ensaio de expressão gênica com o sistema em plasmídeo único da T7 RNA pol com o *switch* ZIKV1440(2.6) incubada a 37°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios complementados com 500 ng de *trigger* específico, definido como ZIKV1440 (laranja), ou com 500 ng de *trigger* inespecífico, definido como DENV10550 (amarelo), e sem RNA *trigger*, controle (azul). Os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*, o tempo está expresso em minutos (min). Fonte: O próprio autor.

A partir de tais resultados partiu-se para testar condições alternativas para avaliação deste dispositivo com o *switch* ZIKV1440(2.6). Assim efetuou-se as reações a 25°C (visando reduzir a eficiência da T7 polimerase e consequentemente o vazamento do módulo de detecção), ainda utilizando o sistema em plasmídeo único e as quantidades de plasmídeo previamente definidas (75 ng), no entanto aplicando 1000 ng de RNA *trigger* para ativação. Obteve-se nestas condições (Figura 40) uma amplitude de ativação menor para o *trigger* específico em relação ao *trigger* inespecífico nos 2 intervalos analisados, resultando numa expressão do gene repórter

14% e 20% menor, respectivamente aos 10 e 20 minutos de incubação. Sendo as diferenças de resposta entre os tratamentos com *trigger* significativas aos 20 minutos (ANOVA, valor de $p < 0,05$) (Figura 41). A construção apresentou um resultado oposto ao esperado, exibindo uma amplitude de ativação maior para o *trigger* inespecífico DENV10550 e levantando o questionamento se o riboregulador ZIKV1440(2.6) funciona devidamente.

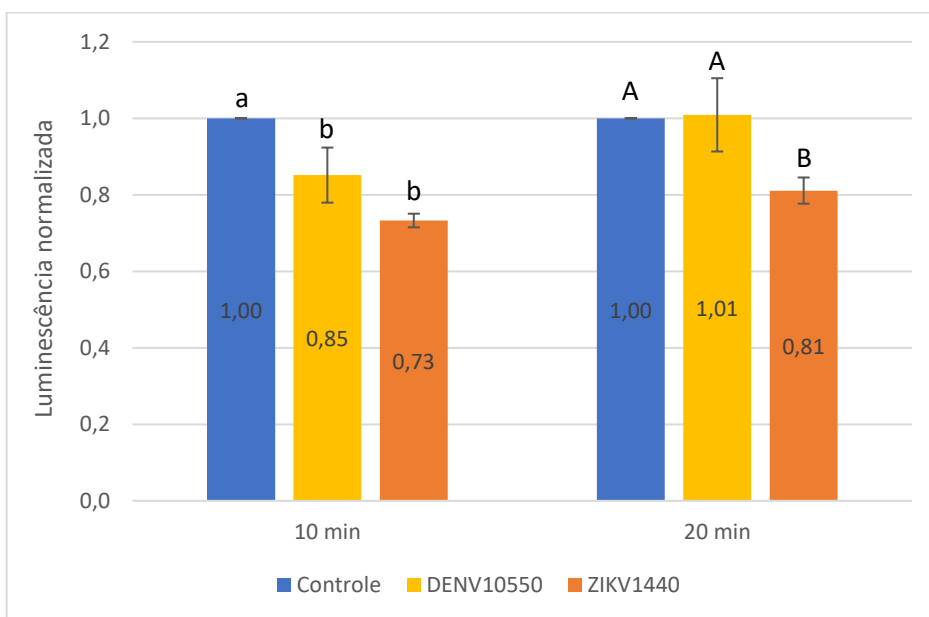


Figura 40 Gráfico das médias de luminescência do ensaio de expressão gênica com o dispositivo T7 RNA pol em plasmídeo único com o *switch* ZIKV1440(2.6) incubada a 25°C. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica realizados complementados com 1000 ng de *trigger* específico, definido como ZIKV1440 (laranja), ou com 1000 ng de *trigger* inespecífico, definido como DENV10550 (amarelo), e sem RNA *trigger*, controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*, o tempo está expresso em minutos (min). Análise estatística ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação por teste de Tukey (valor $p < 0,05$) foram avaliados individualmente para cada intervalo. Fonte: O próprio autor

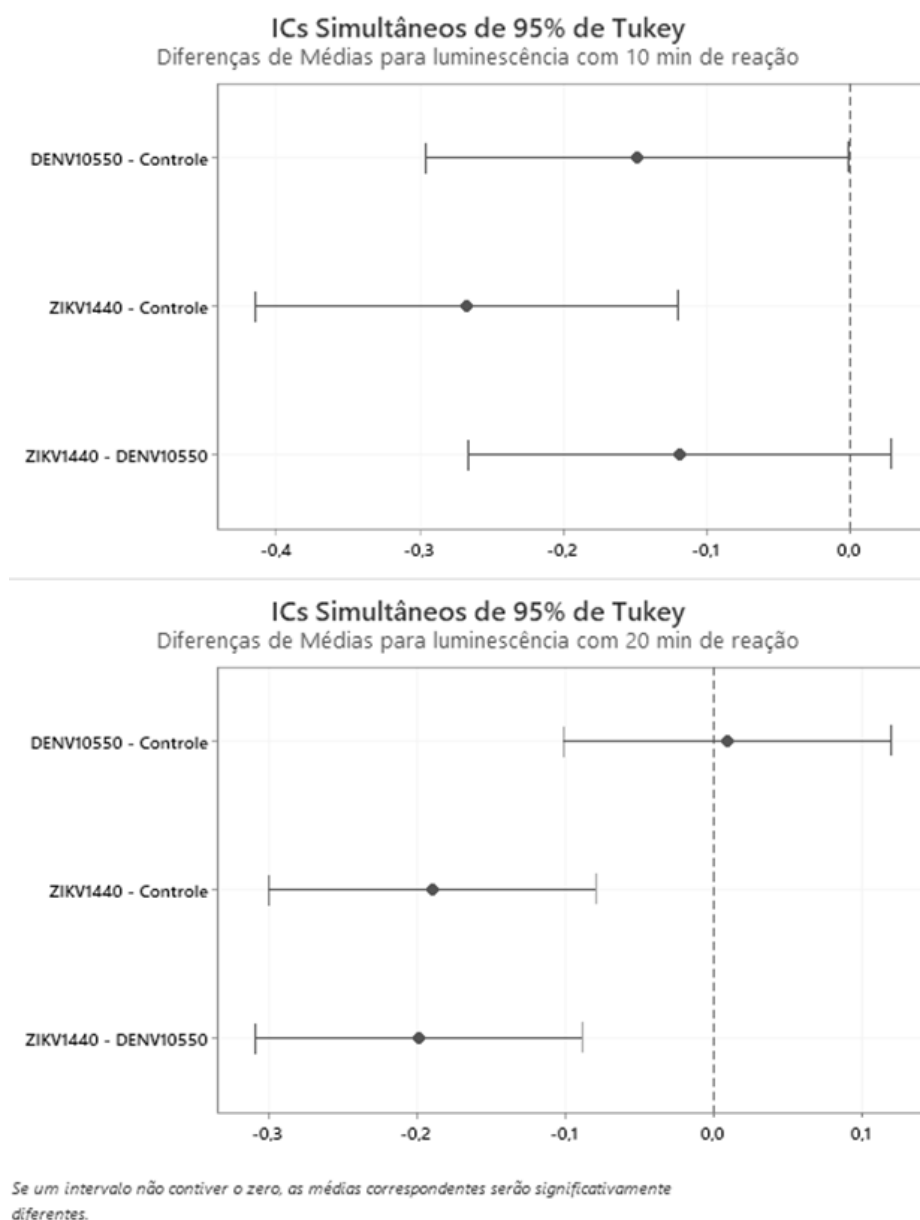


Figura 41 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7 RNA pol com o *switch* ZIKV1440(2.6) a 25°C aplicando 500 ng de *trigger*. Intervalo de confiança de 95%. Aos 10 minutos, apenas o controle apresentou médias significativamente diferente dos demais tratamentos, com 20 minutos as reações com DENV10550 e ZIKV1440 apontam médias significativamente diferentes entre si. Fonte: O próprio autor.

Por outro lado, nos experimentos de expressão gênica *in vitro* com o dispositivo em dois plasmídeos, T7RNApol 2p 50:10, houve uma resposta minimamente positiva, mas pouco específica (Figura 42). Aos 10 minutos de incubação a expressão do gene repórter foi 11% maior na reação com RNA *trigger* específico, alcançando uma amplitude de ativação 20% maior aos 20 minutos.

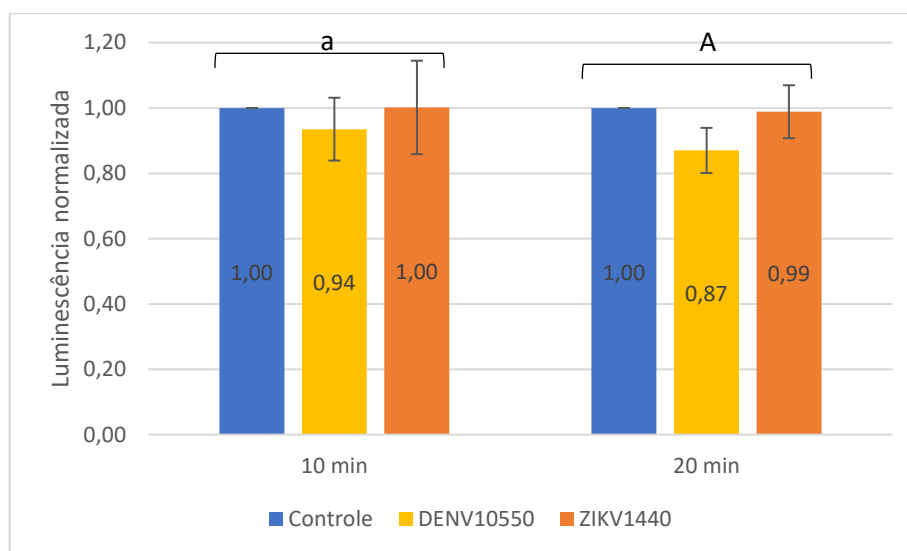


Figura 42 Luminescência média do ensaio de expressão gênica dispositivo T7 RNA pol 2p 50:10 com o *switch* ZIKV1440(2.6) adicionando 500 ng de *trigger*. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica complementados com 500 ng de *trigger* inespecífico, DENV10550 (amarelo), ou *trigger* específico, ZIKV1440 (laranja), e sem RNA *trigger*, reação controle (azul). As reações foram realizadas em quadruplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*. O cálculo da diferença estatística (ANOVA (valor $p < 0,05$), comparação por teste de Tukey) foram avaliados individualmente para cada intervalo. Fonte: O próprio autor.

Contudo este aumento de amplitude não foi estatisticamente significativo (Figura 43) quando se averiguou os dados por ANOVA fator único (valor $p < 0,05$) e teste de Tukey (valor $p < 0,05$). Além de que, como constatado para o dispositivo T7RNApol 2p 50:10 com o *switch* DENV10550(2), os experimentos nestas condições estão sujeitos ao vazamento da T7 RNA polimerase, assim como identificado nos ensaios do sistema em plasmídeo único.

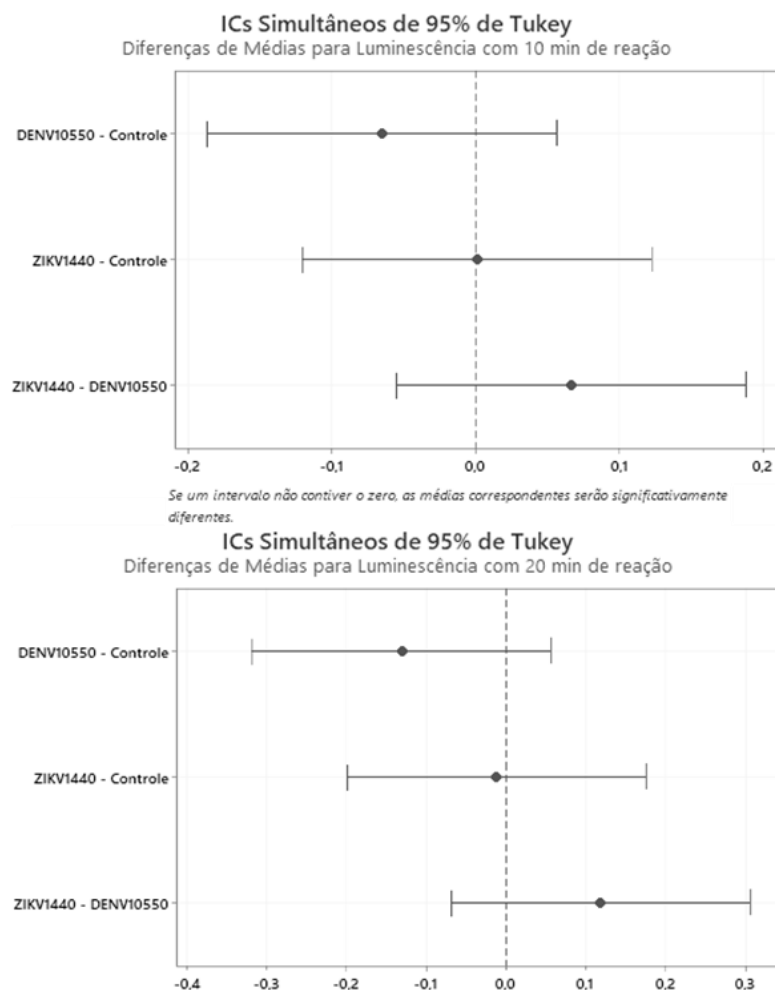


Figura 43 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7 RNA pol 2p (50-10) com o *switch* ZIKV1440(2.6) aplicando 500 ng de *trigger*. Intervalo de confiança de 95%, todos os intervalos de comparação entre tratamentos apresentaram médias sem diferença significativa. Fonte: O próprio autor.

Nos ensaios utilizando a proporção de 10:100, 10 ng do módulo de detecção e 100 ng do módulo de resposta (T7RNA pol 2p 10:100), avaliou-se a resposta aos 5, 10 e 20 minutos de incubação. Os resultados deste dispositivo, em que se adicionou 500 ng de RNA *trigger*, são exibidos figura 44. Observa-se uma amplitude de ativação maior, em média, nas reações com o *trigger* inespecífico em todos os intervalos. A ativação da expressão do gene repórter foi 35% menor aos 5 minutos, aproximadamente 32,9% menor com 10 minutos de reação e 25,4% menor aos 20 minutos quando comparadas as reações com *trigger* específico ZIKV1440 e o *trigger* inespecífico DENV10550. Mesmo com esses números, a análise da variância ANOVA fator único (valor $p < 0,05$) não mostrou diferença significativa entre os tratamentos dos ensaios (Figura 45).

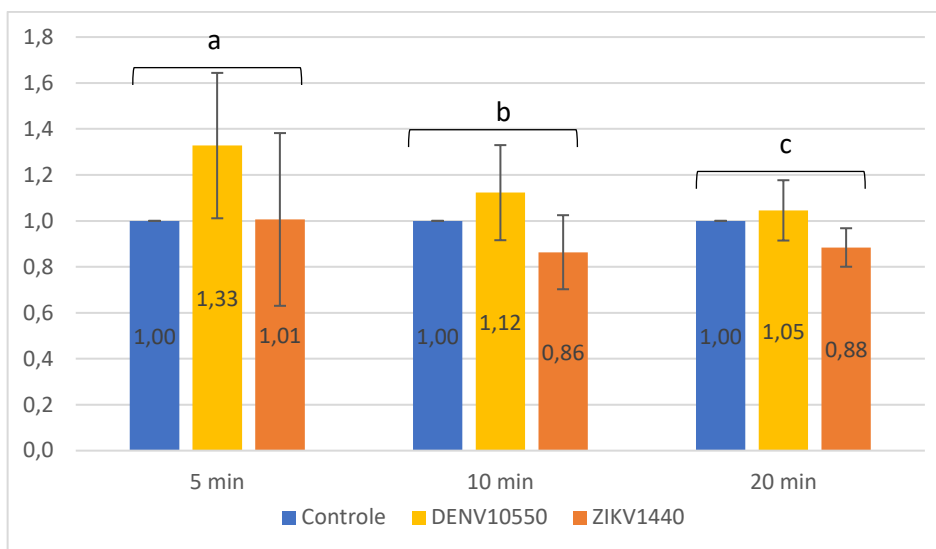


Figura 44 Luminescência média do ensaio de expressão gênica com o sistema T7 RNA pol 2p 10:100 com o *switch* ZIKV1440(2.6) aplicando 500 ng de *trigger*. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica complementados com 500 ng de *trigger* inespecífico, DENV10550 (amarelo), ou com 500 ng de *trigger* específico, ZIKV1440 (laranja), e sem RNA *trigger*, reação controle (azul). As reações foram realizadas em quadruplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*. O cálculo da diferença estatística por ANOVA (valor $p < 0,05$), comparação por teste de Tukey (95% de confiança) foram avaliados individualmente para cada intervalo. Fonte: O próprio autor

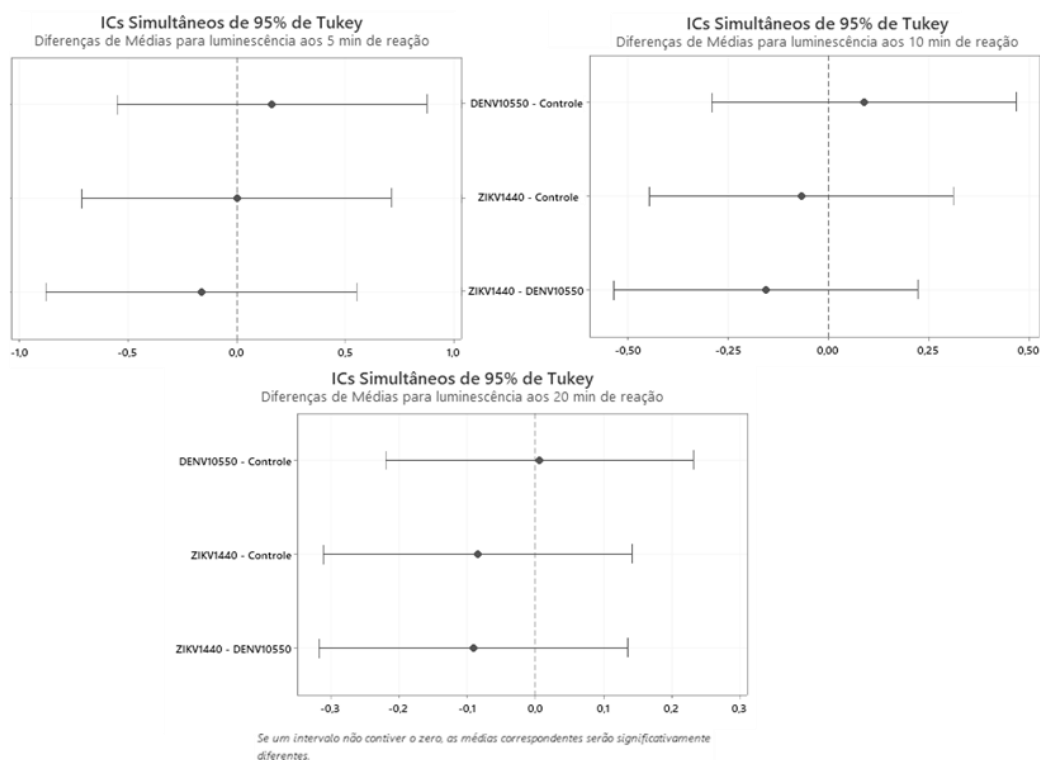


Figura 45 Teste de Tukey para ensaio do sistema T7 RNA pol 2p 10:100 com o *switch* ZIKV1440(2.6) aplicando 500 ng de *trigger*. Intervalo de confiança de 95%, todos os intervalos

de comparação entre tratamentos apresentaram médias sem diferença significativa. Fonte: O próprio autor

Tais resultados são similares ao padrão observado nos ensaios feitos a 25°C com dispositivo em plasmídeo único e corroboram para o questionamento da funcionalidade do riboregulador ZIKV1440(2.6).

4.2.3. Reavaliação dos *switches*

Os resultados preliminares com sistemas de sinalização da T7RNAPol levaram a reavaliação da regulação da expressão gênica *in vitro* dos *switches* utilizando os plasmídeos pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker (ZOCCA, 2018), pT7luc(GCA)_ZIKV1440 Switch(2.6)_linker (PAIVA, 2018) e pSB1C3_ZIKV1440Switch(2.6)_EPICluc, nos quais o gene repórter *luc* ou *Epicluc* tem a expressão controlada diretamente pelo *switch*.

Riboregulador ZIKV1440(2.6)

Os ensaios de expressão *in vitro* com o plasmídeo pT7luc(GCA)_ZIKV1440Switch (2.6)_linker foram realizados de forma similar ao descrito por Paiva (2018), normalizando-se os resultados de luminescência pela resposta da reação com o *trigger* inespecífico, no caso *trigger* DENV10550. No entanto, utilizou-se 5 ng do plasmídeo pT7luc(GCA)_ZIKV1440Switch (2.6)_linker na reação ao invés de 10 ng de vetor. Logo que a funcionalidade deste riboregulador seria testada novamente, avaliou-se também a resposta do dispositivo durante diferentes intervalos, não se limitando a uma incubação de 10 minutos como no trabalho anterior.

Os resultados desta avaliação são apresentados nas figuras abaixo. A figura 46 dispõe os resultados das reações incubadas durante 5, 10 e 20 minutos a 37°C, sendo adicionados 500 ng de RNA *trigger* (específico ou inespecífico) na reação. Esperava-se uma amplitude de ativação aproximadamente 2 vezes maior na reação com RNA alvo ZIKV1440, uma vez que de acordo com os testes de Paiva (2018), apresentados na figura 9, com 400 ng de RNA *trigger* a amplitude de ativação para o RNA alvo específico era quase o dobro em relação ao inespecífico, alcançando 2,89 vezes com 700 ng RNA *trigger*. No entanto, nos novos ensaios realizados (Figura 46) não se observou especificidade do riboregulador ZIKV1440(2.6), apresentando amplitudes de ativação similares entre os dois *triggers*. Um pequeno aumento de 6%,

não significativo (ANOVA fator único ($p < 0,05$) resultou valor de $p = 0,46$), é notado aos 20 minutos de reação, em razão deste fato novos ensaios com uma incubação maior foram realizados para avaliar se a resposta do dispositivo melhoraria com uma reação mais longa

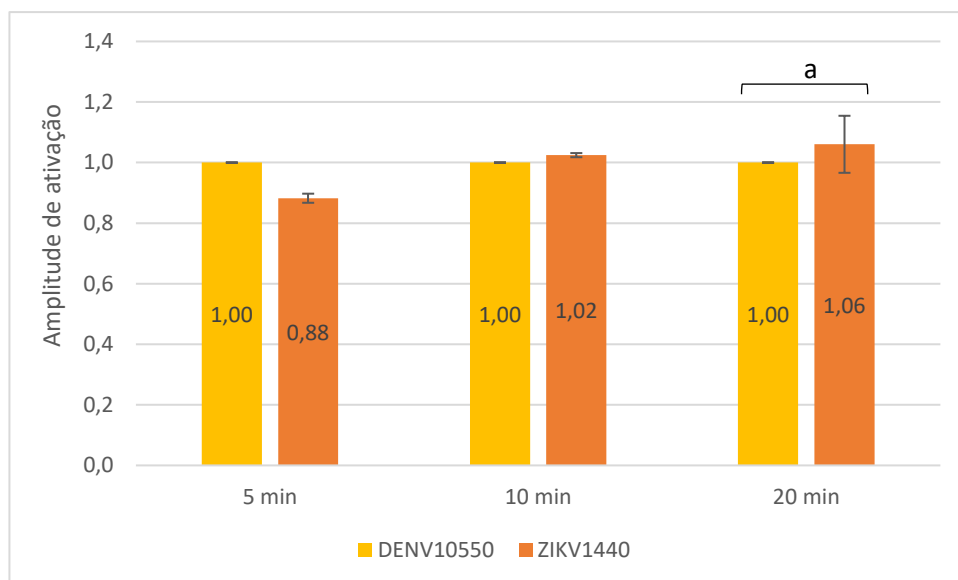


Figura 46 Amplitude de ativação do plasmídeo pT7luc(GCA)_ZIKV1440Switch(2.6)_linker com 5, 10 e 20 min de incubação. Resultados de luminescência normalizados dos ensaios a complementados com 500 ng de *trigger* específico (ZIKV1440), em laranja, e inespecífico (DENV10550), em amarelo. Dados normalizados pelo RNA *trigger* inespecífico Fonte: O próprio autor

Os resultados dos experimentos de expressão gênica *in vitro* de maior incubação são representados na figura 47, que avaliou a resposta do dispositivo com 0,5, 1 e 2 horas. Porém, também não se constatou diferença na amplitude de ativação entre os dois *triggers*.

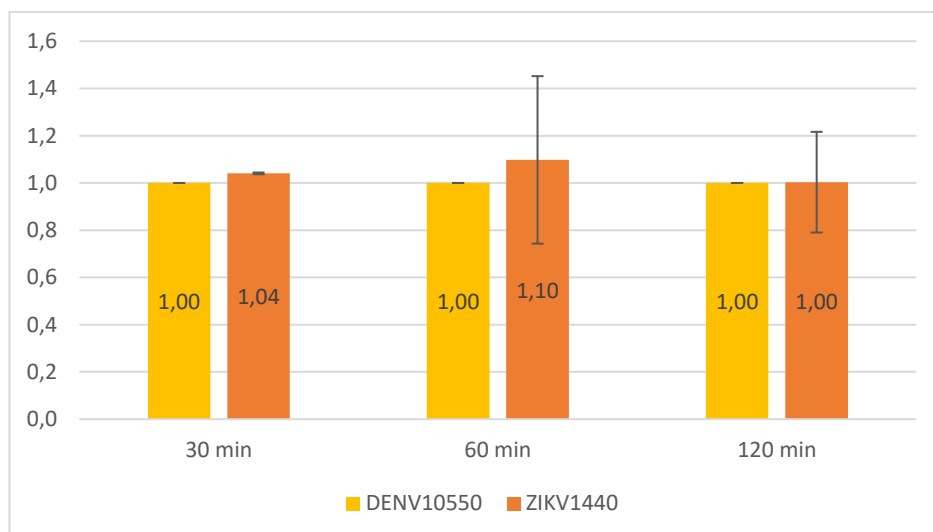


Figura 47 Amplitude de ativação do plasmídeo pT7luc(GCA)_ZIKV1440Switch(2.6)_linker com 30, 60 e 120 min de incubação. Resultados de luminescência normalizados dos ensaios complementados com 500 ng de *trigger* específico (ZIKV1440), em laranja, e inespecífico (DENV10550), em amarelo. Dados normalizados pelo RNA *trigger* inespecífico. Fonte: O próprio autor.

Ainda, na avaliação do *switch* ZIKV1440(2.6) testou-se também a funcionalidade deste riboregulador no plasmídeo pSB1C3_ZIKV1440Switch(2.6)_EPICluc, que emprega o mesmo gene repórter que o sistema de sinalização baseado na T7 RNA polimerase (gene *Epicluc*). Nos ensaios com essa construção normalizou-se a luminescência bruta pelos valores apresentados pelo controle sem *trigger* e foram utilizados 1 ng do plasmídeo em cada reação. Inicialmente se mensurou a ativação do dispositivo frente a 500 ng de RNA *trigger* (Figura 48). Tal teste apontou o mesmo padrão de resposta, em que não se observa especificidade do riboregulador, sendo notado uma ativação apenas 7,2% maior aos 20 minutos, mas não significativa (ANOVA fator único (valor $p < 0,05$) resultou valor de $p = 0,628$).

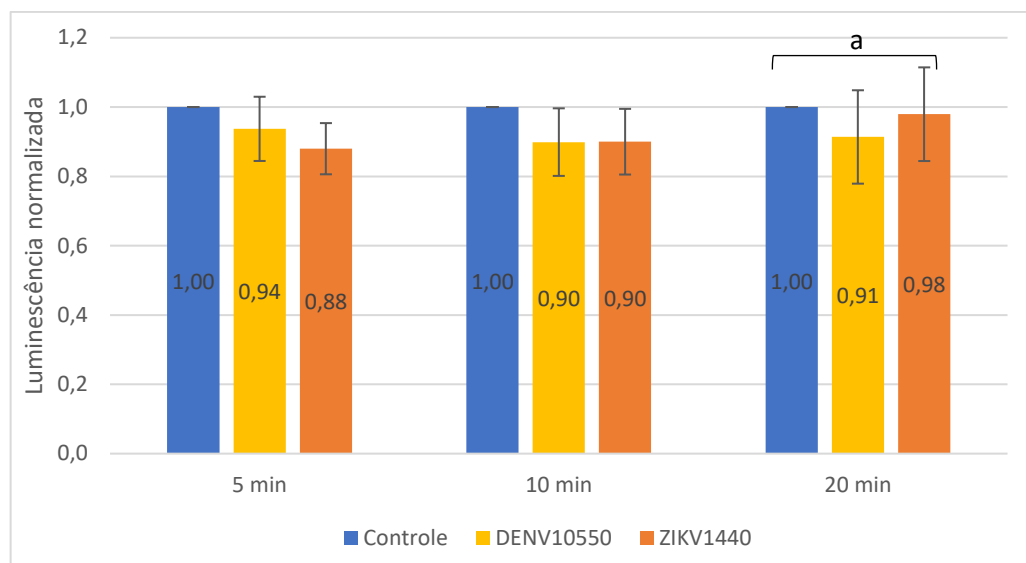


Figura 48 Amplitude de ativação do *switch* ZIKV1440(2.6) utilizando o plasmídeo pSB1C3_ZIKV1440Switch(2.6)_EPICluc e aplicando 500 ng de *trigger*. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica *in vitro* a 30 °C e complementados com 500 ng de *trigger* inespecífico, DENV10550 (amarelo), *trigger* específico, ZIKV1440 (laranja), e sem RNA *trigger*, reação controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*. O cálculo da diferença estatística foi feito por ANOVA (valor $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor

Em uma última tentativa de se obter uma amplitude de expressão maior para o RNA alvo específico, como foi estimado *in silico*, realizou-se um novo ensaio aplicando 1000 ng de RNA alvo (Figura 49). Embora tenha se atingido uma amplitude de ativação maior aos 20 minutos de reação quando comparado ao teste com 500 ng de *trigger*, alcançando uma resposta 12,5% maior com o RNA alvo específico ZIKV1440. Tais valores médios de luminescência não apresentam diferença estatisticamente significativa, ANOVA fator único ($p < 0,05$) resultou um valor de $p = 0,256$.

Devido à falta de especificidade, este riboregulador foi abandonado para a construção do sistema de sinalização utilizando as integrases.

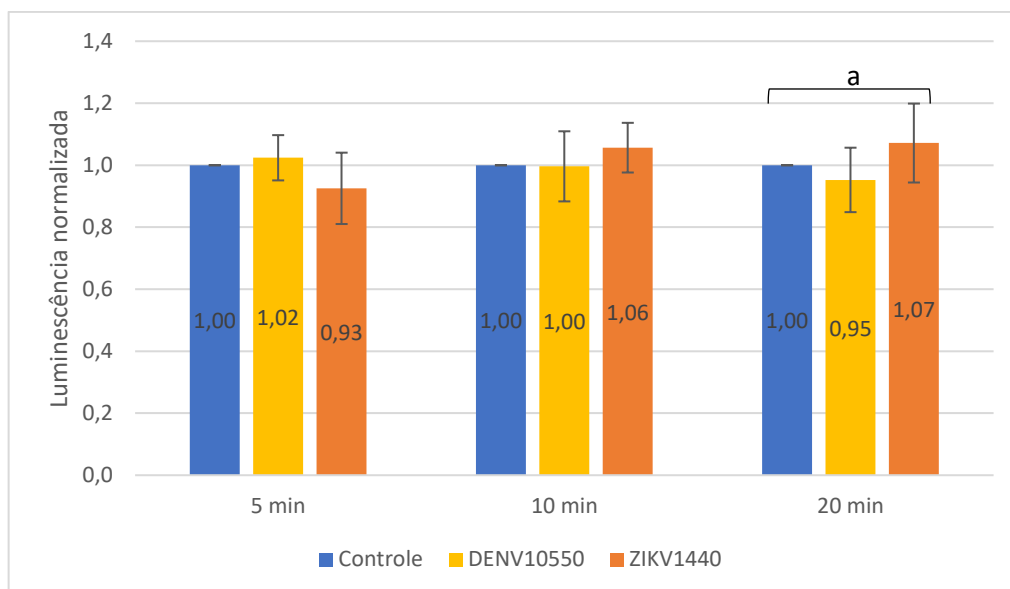


Figura 49 Amplitude de ativação do *switch* ZIKV1440(2.6) utilizando o plasmídeo pSB1C3_ZIKV1440Switch(2.6)_EPICluc e aplicando 1000 ng de *trigger*. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica *in vitro* a 30 °C e complementados com 1000 ng de *trigger* inespecífico, DENV10550 (amarelo), ou *trigger* específico, ZIKV1440 (laranja), e sem RNA *trigger*, reação controle (azul). As reações foram realizadas em quadruplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*. O cálculo da diferença estatística foi feito por ANOVA (valor $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor

Riboregulador DENV10550(2)

Utilizou-se o plasmídeo pT7luc_DENV10550Switch(2)_linker construído por Zocca (2018) para reavaliação da funcionalidade do *switch* DENV10550. Usando esse dispositivo regulatório, foram realizados ensaios de expressão gênica *in vitro* empregando 10 ng e 0,1 ng do plasmídeo por reação, frente a 500 ng de *trigger*, e examinou-se a resposta durante 10 e 20 minutos de incubação. Diferentemente do trabalho anterior, normalizou-se a luminescência pela reação controle e não pela reação com o RNA *trigger* inespecífico.

Nas reações com 10 ng do plasmídeo (Figura 50), verifica-se que RNA *trigger* específico gerou um aumento de sinal em torno de 1,8 vezes maior aos 10 minutos, alcançando uma ativação 2,18 vezes maior aos 20 minutos de reação quando comparado com *trigger* inespecífico ZIKV1440. A análise ANOVA ($p < 0,05$) atestou diferença significativa entre os tratamentos e o teste de Tukey ($p < 0,05$) apontou quais médias diferiam (Figura 51).

Para compararmos com os resultados reportados por Zocca (2018), normalizou-se os dados de luminescência pela resposta com o RNA *trigger*

inespecífico ZIKV1440. Com este método de normalização a amplitude de resposta é 1,91 vezes maior aos 10 minutos e 2,22 vezes maior aos 20 minutos, ainda inferiores as amplitudes relatadas por Zocca (2018), de aproximadamente 4,5 vezes maior na reação com o *trigger* DENV10550 (experimento realizado com 10 minutos de incubação).

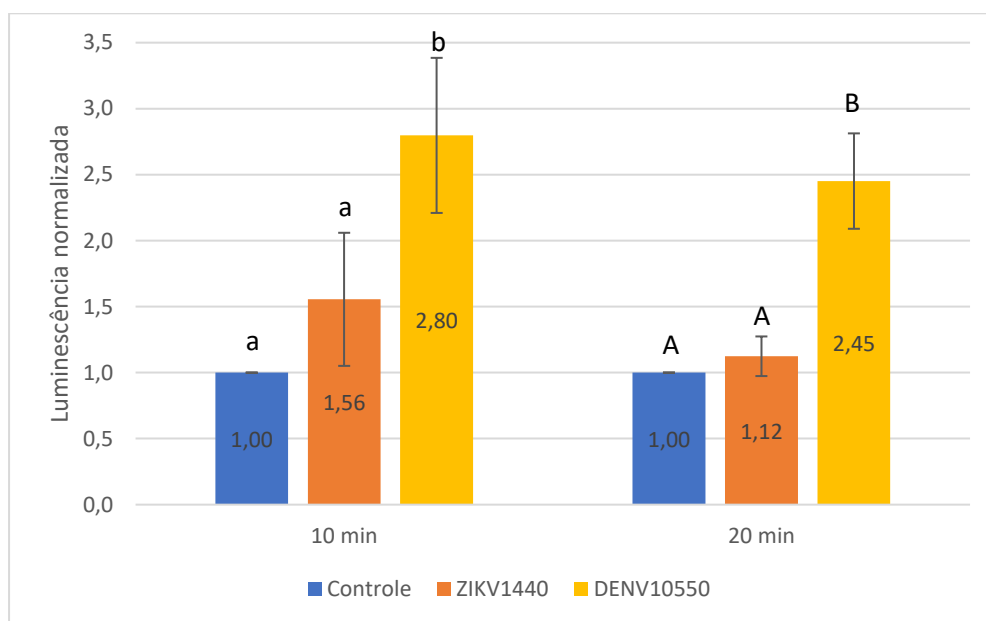


Figura 50 Amplitude de ativação do *switch* DENV10550(2) utilizando o plasmídeo 10 ng do pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica *in vitro* a 30 °C e complementados com 500 ng de *trigger* específico, DENV10550 (amarelo), *trigger* inespecífico, ZIKV1440 (laranja), e sem RNA *trigger*, reação controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*. Análise estatística por ANOVA (valor $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor

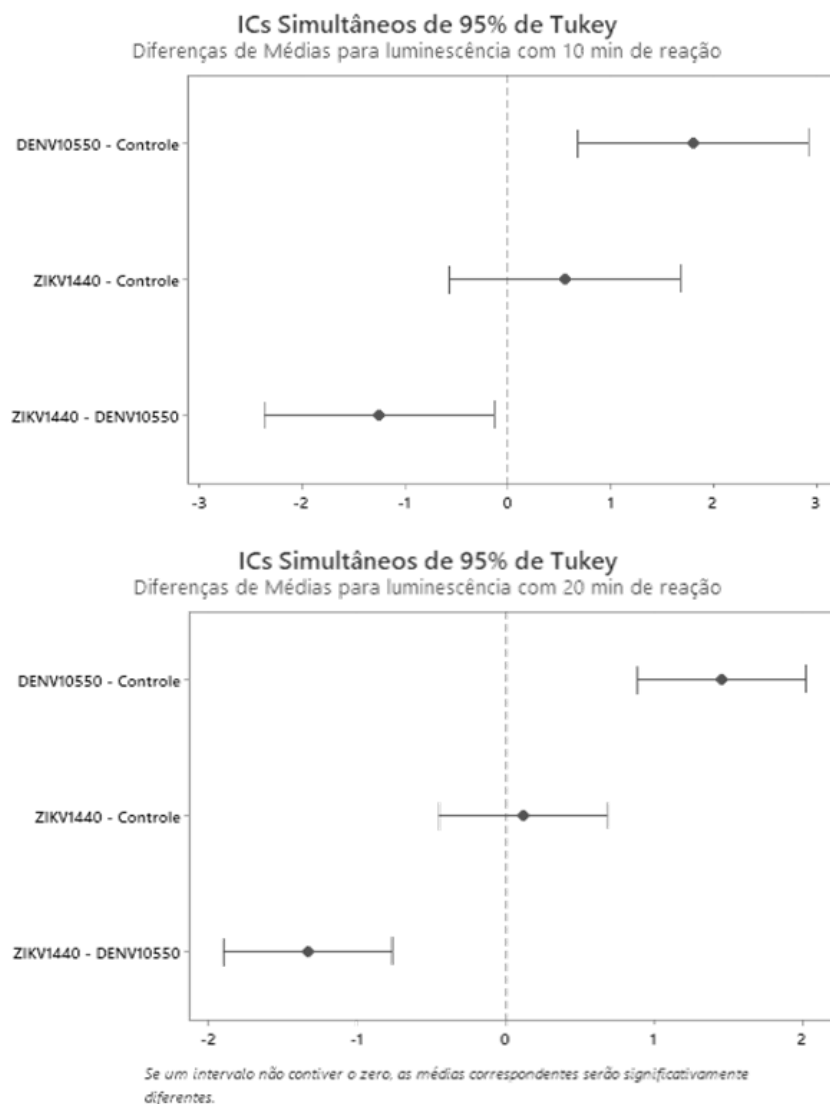


Figura 51 Teste de Tukey para ensaio com 10 ng do plasmídeo pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker aplicando 500 ng de *trigger*. Intervalo de confiança de 95%, os tratamentos com o RNA alvo específico, DENV10550, apresentaram médias significativamente diferentes nos dois intervalos (10 e 20 minutos) entre os demais tratamentos (Controle e ZIKV1440). Fonte: O próprio autor

Embora o dispositivo tenha apresentado uma resposta específica, a luminescência bruta inicial no estado *off* (sem *trigger*) foi muito superior ao limite definido de 800 UA. Assim diminuiu-se a quantidade de plasmídeo empregado para se encaixar em dado limiar. Os ensaios utilizando 0,1 ng de plasmídeo foram realizados introduzindo 500 ng de RNA *trigger* nas reações, nestes experimentos o RNA ZIKV9452 foi usado como RNA *trigger* inespecífico. A resposta gerada aos 10 minutos demonstra uma ativação 1,79 vezes maior para a reação com RNA alvo específico e 1,85 vezes maior aos 20 minutos quando comparado com *trigger* inespecífico (Figura 52). Utilizou-se ANOVA ($p < 0,05$), individualmente para cada

intervalo, para investigar se havia diferença significativa entre os tratamentos e o teste de Tukey ($p < 0,05$) apontou quais médias diferiam entre si (Figura 53).

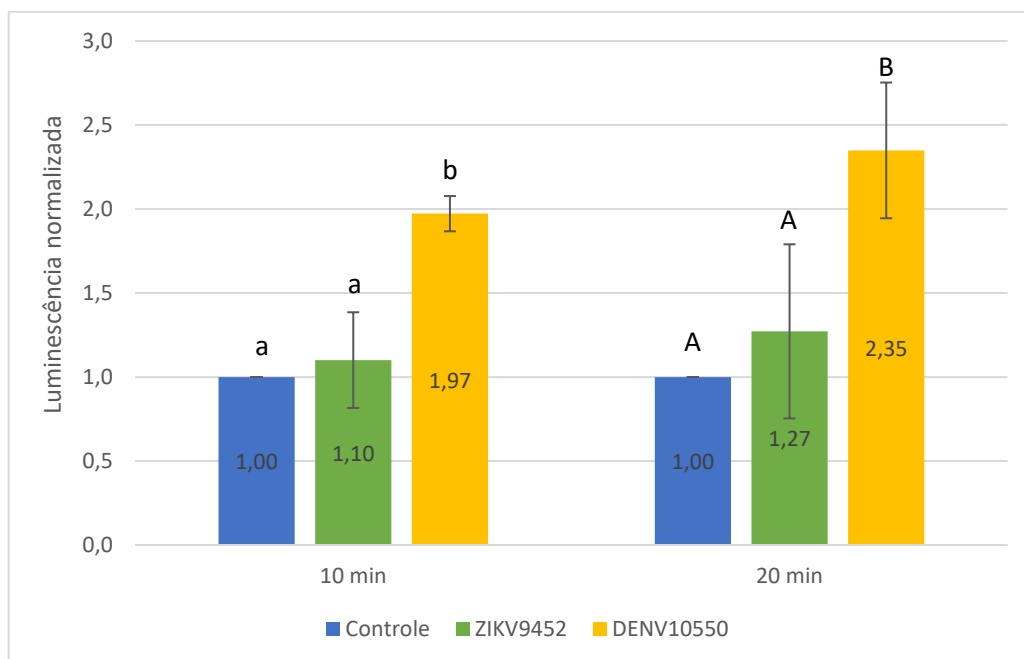


Figura 52 Amplitude de ativação do *switch* DENV10550(2) utilizando o plasmídeo 0,1 ng do pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker. Comparação das médias de luminescência dos ensaios de expressão gênica *in vitro* a 30°C e complementados com 500 ng de *trigger* inespecífico, ZIKV9452 (verde), ou *trigger* específico, DENV10550 (amarelo), e sem RNA *trigger*, reação controle (azul). As reações foram realizadas em triplicata e os valores de luminescência foram normalizados pelo controle sem RNA *trigger*. O cálculo da variância foi feito por ANOVA (valor $p < 0,05$) e comparação por teste de Tukey (valor $p < 0,05$). Fonte: O próprio autor

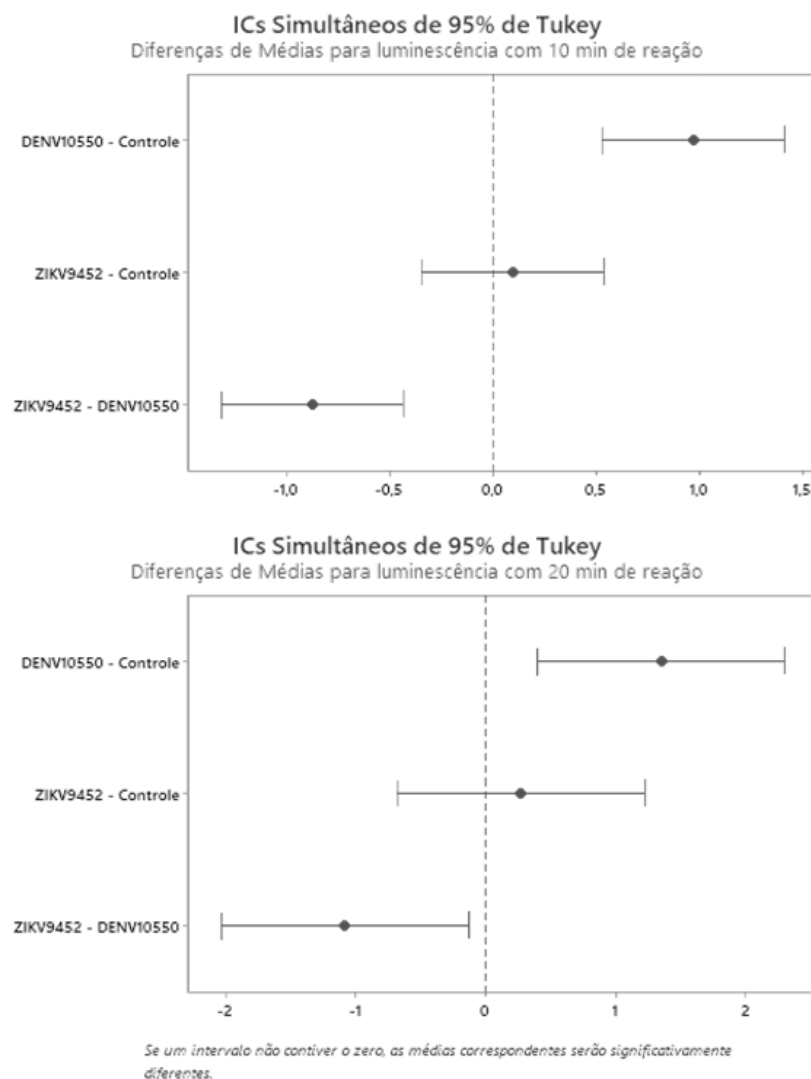


Figura 53 Teste de Tukey para ensaio com 0,1 ng do plasmídeo pT7luc(GCA)_DENV10550Switch(2)_linker aplicando 500 ng de *trigger*. Intervalo de confiança de 95%, os tratamentos com o RNA alvo específico, DENV10550, apresentaram médias significativamente diferentes nos dois intervalos (10 e 20 minutos) entre os demais tratamentos (Controle e ZIKV9452). Fonte: O próprio autor.

O trabalho de Zocca (2018) também atingiu uma amplitude de ativação aproximadamente 1,75 vezes maior com o RNA alvo específico com 10 minutos de incubação, mas foi utilizada a normalização da luminescência pelos resultados com RNA *trigger* inespecífico. Se utilizarmos este mesmo método de normalização nesta reavaliação tem-se que a amplitude de resposta para o RNA alvo específico é 2,02 vezes maior aos 10 minutos e 2,07 vezes maior aos 20 minutos de incubação.

4.2.4. Sistema de amplificação baseado na integrase 13

O riboregulador ZIKV1440(2.6) não foi utilizado na construção deste sistema de sinalização devido aos resultados apresentados anteriormente, em que não se

observou seletividade para o RNA alvo e até mesmo resultando em amplitudes de expressão gênica superiores para reações com RNA *trigger* inespecífico. Desse modo, foi decidido continuar apenas com o *Toehold switch* de detecção para dengue.

Nesta estratégia, assim como no sistema com a T7 RNA polimerase, as duas unidades de transcrição do sistema foram separadas em dois plasmídeos. Um vetor com o módulo de detecção (*switch* DENV10550(2) regulando a expressão da integrase) e outro com o módulo de resposta (promotor T7 invertido flanqueado pelos sítios de reconhecimentos (*attB*-PT7-*attP*) específicos da integrase e o gene da EPIC luciferase sob controle deste).

Foram construídos os módulos de detecção com a integrase 13 (referente ao plasmídeo pSB1C3_SwDENV_Int13) e com a integrase 9 (plasmídeo pSB1C3_SwDENV_Int9). As construções foram confirmadas inicialmente pela corrida de eletroforese em gel e posteriormente confirmadas por sequenciamento pelo método de Sanger (Figura A9 e A10 do Anexo I – Resultado dos sequenciamentos). Obtidos os plasmídeos de detecção, seguiu-se para a construção dos vetores com o módulo de resposta. Para tanto construiu-se primeiro o plasmídeo contendo apenas o RBS e a ORF da EPICluc, gerando o plasmídeo pSB1C3_RBS-EPICluc, o resultado do sequenciamento confirmando esta construção encontra-se na Figura A8 do Anexo I. Esse vetor serviria como base para introdução dos insertos dos sítios de reconhecimentos específicos para cada integrase. A clonagem dos sítios de reconhecimento se deu pela ligação dessas partes obtidas como par de oligonucleotídeos (453 e 454 da tabela 3 para a Int9, e 455 e 456 para a Int13) com o vetor pSB1C3_RBS-EPICluc digerido no *Biobrick* prefixo com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*, uma vez que as partes *attB*-PT7-*attP* possuem *overhang* da enzima *EcoRI* na extremidade 5' e da *SpeI* na extremidade 3'. Após diversos ciclos de clonagem, um aparente resultado positivo foi obtido. A figura 54 apresenta a foto da eletroforese em gel agarose da comparação das digestões dos plasmídeos pSB1C3_RBS-EPICluc e pSB1C3_att(Int13)_EPICluc, realizadas para confirmar preliminarmente a construção pSB1C3_att(Int13)_EPICluc.

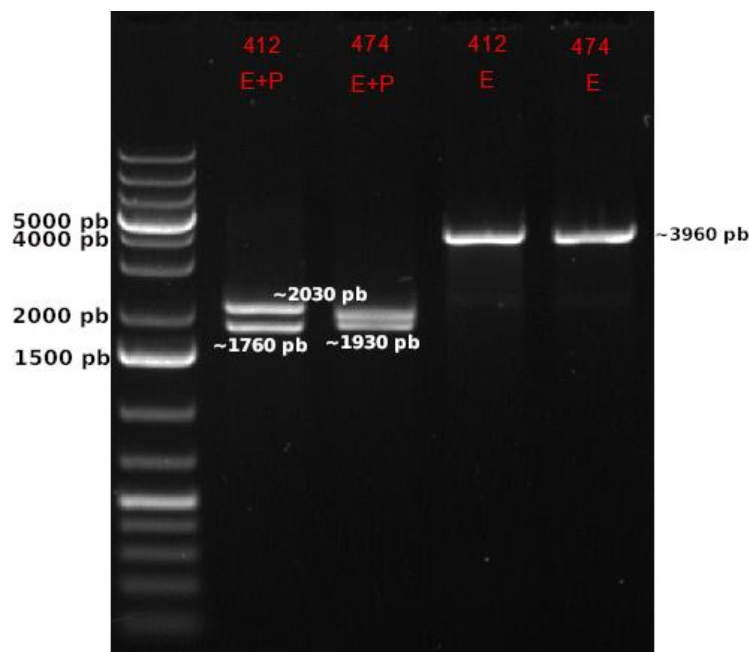


Figura 54 Comparação da digestão dos plasmídeos pSB1C3_RBS-EPICluc e pSB1C3_att(Int13)_EPICluc. Na figura a construção pSB1C3_RBS-EPICluc é nomeado 412 e o vetor pSB1C3_att(Int13)_EPICluc é denominado 474. O poço identificado 412 E+P é referente a digestão de pSB1C3_RBS-EPICluc com as enzimas *EcoRI* e *PstI*; já o poço 474 E+P é da digestão de pSB1C3_att(Int13)_EPICluc também com *EcoRI* e *PstI*. Os dois outros poços são das digestões apenas com *EcoRI*, no entanto não se observa diferença do padrão de banda dos plasmídeos linearizados, afinal o inserto attB-PT7-attP(Int13) tem apenas 165 pb. Foram destacadas as bandas de 2030 pb pertencente ao vetor pSB1C3 vazio e as bandas de 1760 relativa ao inserto RBS-EPICluc, além da banda de 1930 pb do inserto attB-PT7-attP(Int13)_EPICluc. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA ladder. Fonte: O próprio autor.

Seguindo para a confirmação definitiva, o sequenciamento da construção pSB1C3_att(Int13)_EPICluc não gerou resultado na reação com o *primer forward* 49. Esta reação amplifica a porção 5' do inserto do módulo de resposta. Diversas tentativas de sequenciamento utilizando o plasmídeo construído como molde foram realizadas, mas não geraram resultado. Contudo o sequenciamento com o *primer 50 reverse* apresentou resultado em todas as tentativas. A figura 55 abaixo expõe o alinhamento deste sequenciamento com a construção desenhada, confirmando a porção final do gene da EPICluc.

```

Seq_1 261 AAAAGAAATCGTGGACTACGTCGCCTCGCAGGTGACCACCGCTAAAAAGTTGCGTGGTGG 202
      |||
Seq_2 3719 AAAAGAAATCGTGGACTACGTCGCCTCGCAGGTGACCACCGCTAAAAAGTTGCGTGGTGG 3778

Seq_1 201 CGTGGTGTGTTGTGGATGAAGTGCCGAAAGGCCTGACGGGTAAACGTGATGCACGTAAGAT 142
      |||
Seq_2 3779 CGTGGTGTGTTGTGGATGAAGTGCCGAAAGGCCTGACGGGTAAACGTGATGCACGTAAGAT 3838

Seq_1 141 TCGTGAGATCTTGATCAAGGCGAAGAAAGGTGGTAAATCCAAGTTGTAATAACGCTGATA 82
      |||
Seq_2 3839 TCGTGAGATCTTGATCAAGGCGAAGAAAGGTGGTAAATCCAAGTTGTAATAACGCTGATA 3898

Seq_1 81 GTGTAGATCGCTACCAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTGTTACCTAGTAGCGGCCG 22
      |||
Seq_2 3899 GTGTAGATCGCTACCAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTGTTAC-TAGTAGCGGCCG 3957

Seq_1 21 CTGCAGTCCGGCAAAAAAGGG 1
      |||
Seq_2 3958 CTGCA----- 3962

```

Figura 55 Alinhamento do sequenciamento da construção pSB1C3_att(Int13)_EPICluc. Resultado do sequenciamento com *primer* 50 reverse. São destacados, na ordem, a sequência nucleica da parte final do gene da luciferase EPICluc (laranja) e do terminador T500 (marrom). Fonte: O próprio autor, imagens geradas no software Serial Cloner

Desse modo, testou-se a confirmação da porção 5' do inserto por métodos alternativos como PCR com *primers* específicos e digestão para avaliar o padrão de bandas gerado em eletroforese. Para tanto realizou-se uma PCR com *primer forward* específico ao início do inserto, o oligonucleotídeo 455 da tabela 3 (utilizado para a incorporação da sequência do promotor T7 invertido flanqueado pelos sítios de reconhecimento *attB* e *attP* da Int13 ao gene repórter), e o *primer reverse* complementar ao *BioBrick* sufixo, desde modo esperava-se amplificação deste fragmento caso a sequência inicial do inserto estivesse correta. A figura 56 apresenta a foto do gel agarose da PCR citada acima e observa-se uma banda muito forte com tamanho próximo ao esperado para o inserto construído (aproximadamente 1930 pb).

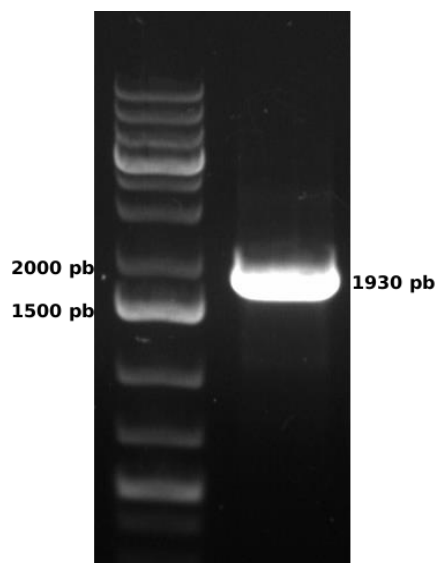


Figura 56 Eletroforese em gel agarose da PCR do inserto att(Int13)_EPICluc. Foram destacadas as bandas de 2000 e 1500 pb do marcador de peso molecular, observa-se uma banda de 1930 pb referente ao amplicon att(Int13)_EPICluc. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA ladder. Fonte: O próprio autor.

Além da PCR, o padrão de bandas do gel da digestão da construção realizada anteriormente ao sequenciamento apresentou bandas próximas aos tamanhos previstos caso a construção estivesse correta (Figura 57). Nesta digestão o plasmídeo foi cortado com as enzimas *EcoRI* e *PstI*, nota-se uma banda por volta de 2030 pb referente ao plasmídeo linearizado e outra em torno de 1930 pb referente ao inserto.

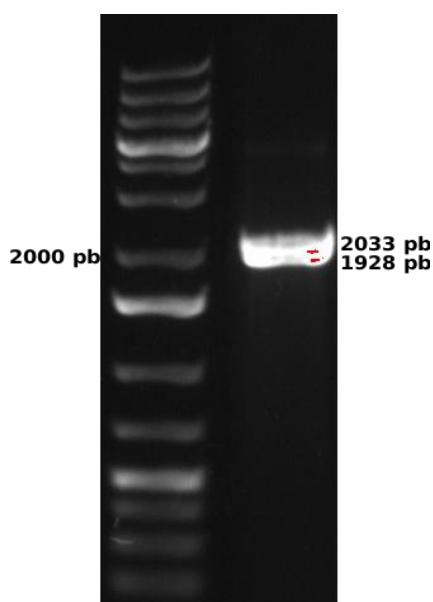


Figura 57 Gel da digestão do plasmídeo pSB1C3_att(Int13)_EPICluc. Foram utilizadas as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, observa-se uma banda de aproximadamente 2030 pb referente ao plasmídeo vazio linearizado e uma banda de aproximadamente 1930 pb referente ao inserto att(Int13)_EPICluc. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA ladder. Fonte: O próprio autor.

Assim como para o sistema anterior, inicialmente realizou-se reações de expressão gênica *in vitro* sem a adição de RNA *trigger* para se padronizar a quantidade de cada plasmídeo, seguindo depois para os ensaios empregando os RNA *triggers*. Porém, devido a resultados preliminares conflitantes nas reações com RNA *trigger*, buscou-se novamente confirmar a sequência do início do inserto do plasmídeo de resposta, a única porção sem confirmação definitiva. Desta vez como molde para a reação de PCR do sequenciamento utilizou-se o produto da PCR do vetor de resposta (pSB1C3_att(Int13)_EPICluc) amplificado com os *primers* 49 *foward* e 50 *reverse* (estes iniciadores são complementares a sequências do plasmídeo pSB1C3 que flanqueiam a região em que o inserto é clonado). O produto desta PCR apresentou uma banda inespecífica maior que a banda de interesse (Figura 58), provável razão pela qual os sequenciamentos anteriores de pSB1C3_att(Int13)_EPICluc não geravam resultados. A banda com tamanho próximo ao esperado (1930 pb) foi purificada e utilizada molde para a PCR de sequenciamento.

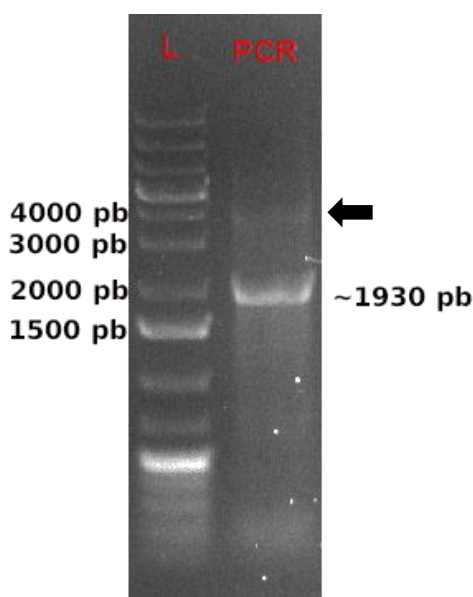


Figura 58 Gel do produto da PCR de pSB1C3_att(Int13)_EPICluc amplificado com os primers 49 fw e 50 rv. Foram destacadas as bandas de 1500, 2000, 3000 e 4000 pb do marcador de peso molecular. Observa-se uma banda na PCR de 1930 pb (destacada) supostamente referente ao amplicon attB-PT7-attP(Int13)_EPICluc e uma outra banda maior mais fraca entre 3000 e 4000 pb. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA ladder. Fonte: O próprio autor

O alinhamento do resultado do sequenciamento é apresentado na figura abaixo, sendo evidente a ausência da parte contendo o promotor flanqueado pelos sítios *attB* e *attP*. Observa-se o *Biobrick* prefixo completamente (rosa escuro) e a parte

seguinte em que há anelamento se trata do RBS (rosa claro) e o início do gene da EPICluc (laranja) (Figura 59).

```

Seq_1 1981 GAATTCAGATAAAAAAAAAATCCTTAGCTTCGCTAAGGATGATTCTG-----GAATTCG 2035
Seq_2 1      -----TGATTCTGGCTATGAATTCG 21

Seq_1 2036 CCGCCGCTTCTAGAGGCATACATTGTTGTTGTTTTCCAGATCCAGTTGGTCTGTAAAT 2095
Seq_2 22      CCGCCGCTTCTAGAG----- 36

Seq_1 2096 ATAAGCAATCCATGTGAGTTGGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCTATTCCGAG 2155
Seq_2 37      ----- 36

Seq_1 2156 TTGTATTATGTTACTAAACAACCTGGTCAAGTTCTACAAATACAACCGTTATTGACTAG 2215
Seq_2 37      ----- 36

Seq_1 2216 AGTTAAGGAGGTAAAAAATGGAGGACGCGAAAAACATCAAGAAAGGCCAGCACCGTT 2275
Seq_2 37      --TTAAGGAGGTAAAAAATGGAGGACGCGAAAAACATCAAGAAAGGCCAGCACCGTT 94

Seq_1 2276 CTATCCGCTGGAAGATGGTACCGCCGGTGAACAATTGCACAAAGCGATGAAACGTTATGC 2335
Seq_2 95      CTATCCGCTGGAAGATGGTACCGCCGGTGAACAATTGCACAAAGCGATGAAACGTTATGC 154

```

Figura 59 Alinhamento do sequenciamento com o desenho do plasmídeo pSB1C3_att(Int13)_EPICluc. Apresentado o resultado do *primer forward*. São destacados, na ordem, as sequências nucleicas do BB prefixo (rosa escuro), do sítio *attB* (verde), do promotor T7 invertido (ciano), do sítio *attP* (castanho), RBS (rosa claro) e o início do gene da EPICluc (laranja). Fonte: O próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*.

Em contrapartida o resultado do sequenciamento é complementar ao vetor pSB1C3_RBS-EPICluc (Figura 60), indicando que o inserto *attB*-PT7-*attP*(Int13) não foi clonado no plasmídeo. Assim, foi iniciada novamente a construção do dispositivo de resposta deste sistema, no entanto a clonagem seguiu sem sucesso até o momento da escrita deste trabalho.

```

Seq_1 1981 GAATTTTCAGATAAAAAAATCCTTAGCTTTTCGCTAAGGATGATTTCTG-----GAATTCG 2035
Seq_2 1      -----TGATTTCTGGCTATGAATTCG 21
          |||||
Seq_1 2036 CGGCCGCTTCTAGAGTTAAGGAGGTAAAAAATGGAGGACGCGAAAAACATCAAGAAAG 2095
Seq_2 22     CGGCCGCTTCTAGAGTTAAGGAGGTAAAAAATGGAGGACGCGAAAAACATCAAGAAAG 81
          |||||
Seq_1 2096 GCCCAGCACCGTTCTATCCGCTGGAAGATGGTACCGCCGGTGAACAATTGCACAAAGCGA 2155
Seq_2 82     GCCCAGCACCGTTCTATCCGCTGGAAGATGGTACCGCCGGTGAACAATTGCACAAAGCGA 141
          |||||
Seq_1 2156 TGAAACGTTATGCGCTGGTTCCGGGTACCATCGCATTACGCGACGCGCATATCGAGGTTA 2215
Seq_2 142    TGAAACGTTATGCGCTGGTTCCGGGTACCATCGCATTACGCGACGCGCATATCGAGGTTA 201
          |||||
Seq_1 2216 ACATCACCTATGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTTTCGTCTGGCCGAGGCAATGAAGCGTT 2275
Seq_2 202    ACATCACCTATGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTTTCGTCTGGCCGAGGCAATGAAGCGTT 261
          |||||

```

Figura 60 Alinhamento do sequenciamento com a construção pSB1C3_RBS-EPICluc. Apresenta-se o resultado do *primer forward*. São destacados, na ordem, as sequências nucleicas do BB prefixo (roxo), do RBS (rosa claro) e o início do gene da EPICluc (laranja). Fonte: O próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*.

5. Conclusões

O sistema com a protease Mf-Lon não apresentou a resposta esperada. Os testes realizados não demonstraram degradação de GFP por parte da protease, o decaimento da fluorescência é mais compatível com o efeito de *quenching* natural da proteína fluorescente após ciclos de excitação. Segundo a literatura, em testes *in vivo* a redução da fluorescência da protease *mf*-Lon alcança mais de 90% a partir de 3-4 horas após a indução da expressão da Mf-lon (CAMERON; COLLINS, 2014). No entanto, após duas horas averiguando a redução da fluorescência em que se aplicou o produto de 4 horas de expressão gênica *in vitro* não houve uma redução significativa da proteína fluorescente.

O sistema de amplificação baseado na T7 RNA polimerase não apresentou inicialmente a funcionalidade esperada para nos ensaios com a construção em plasmídeo único realizados a 30°C e 37°C para ambos os riboreguladores. Tal fato está relacionado ao vazamento da tradução da T7 RNA polimerase controlada pelo riboregulador. Uma vez expressa, a atuação da polimerase não está subordinada à presença ou concentração do RNA *trigger*, nivelando as taxas de expressão do gene repórter. A resposta do sistema em plasmídeo único a 25°C indicou, para o dispositivo com o *switch* DENV10550(2), uma amplitude de ativação 30% maior na reação com

RNA alvo específico, mas para o dispositivo com o *switch* ZIKV1440(2.6) não houve resposta específica.

A separação dos módulos do sistema de sinalização baseado na T7 RNA polimerase em dois plasmídeos mostrou a importância da divisão dos módulos de detecção e de resposta, assim como a relevância da razão/quantidade de cada plasmídeo aplicada nos ensaios. A separação possibilitou um ajuste mais fino da resposta, devido a diminuição do vazamento da polimerase ao se empregar uma menor concentração do dispositivo de detecção. Neste sistema em dois plasmídeos, utilizando o riboregulador DENV10550(2) para detecção, alcançou-se a amplitude de ativação máxima aos 30 minutos de incubação 2,29 vezes superior para a reação com *trigger* DENV10550 (específico) em relação à reação com *trigger* ZIKV9452 (inespecífico). Resultado pouco superior a amplitude atingida no circuito direto de sinalização com o mesmo riboregulador que resultou em uma amplitude de ativação 2,22 vezes maior.

Para o sistema amplificação baseado na integrase, devido a diversas adversidades com a obtenção das partes e clonagem, não foi possível a construção da unidade de resposta. Construiu-se apenas os plasmídeos de detecção com a Int13 e com a Int9. Estes contêm o *switch* DENV10550(2) controlando o gene da integrase. Esta estratégia tem o potencial de ser mais sensível, uma vez que as integrases são unidirecionais nas condições testadas. Assim, estas recombinases têm o potencial de tornar a reação independente da concentração do RNA viral (RNA *trigger*) após seu acúmulo na reação e, em seguida, sua atuação o plasmídeo de resposta geraria uma “memória” pela recombinação dos sítios de reconhecimento (causando a inversão do promotor), alterando o estado da expressão do gene repórter de desligado para ligado permanentemente.

6. Referências bibliográficas

ALBUQUERQUE, M.; SOUZA, W. V.; ARAÚJO, T.; BRAGA, M. C.; MIRANDA FILHO, D. B.; XIMENES, R.; DE MELO FILHO, D. A.; BRITO, C.; VALONGUEIRO, S.; MELO, A.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; MARTELLI, C. The microcephaly epidemic and Zika virus: building knowledge in epidemiology. Epidemia de microcefalia e vírus Zika: a construção do conhecimento em epidemiologia. **Cadernos de saúde pública**, v. 34, n. 10, e00069018, 2018.

ANDERSON, N.W., JESPERSEN, D.J., ROLLINS, L., SEATON, B., PRINCE, H.E., THEEL, E.S. Detection of the dengue virus NS1 antigen using an enzyme immunoassay. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 79, n. 2, p. 194-197, 2014.

BAZ, M.; BOIVIN, G. Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections. **Pharmaceuticals**, Basel, Switzerland, v. 12, n.3, p. 101, 2019, <https://doi.org/10.3390/ph12030101>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. 5. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2016. ISBN 978-85-334-2344-2.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em Saúde no Brasil 2003-2019: Da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. **Bol Epidemiol**. [Online]. Volume especial. Brasília, DF, 2019. ISBN 9352-7864 Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>. Acesso: 20 de maio de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 52. **Bol. Epidemiol.**, Brasília, Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 51, n. 2, 16 de janeiro de 2020. ISSN: 9352-7864. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>. Acesso em: 06 de jun. de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. **Bol. Epidemiol.**, Brasília, Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 52, n. 3, 26 de janeiro de 2021. ISSN: 9352-7864. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf. Acesso em: 14 de abr. de 2021.

CAMERON, D. E.; COLLINS, J. J. Tunable protein degradation in bacteria. *Nature biotechnology*, v. 32, n.12, p. 1276-1281, 2014.

CAO-LORMEAU, V.M., BLAKE, A., MONS, S., LASTERE, S., ROCHE, C., VANHOMWEGEN, J., et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*, v. 387, n. 10027, p. 15319, 2016.

CHOI, K. H.; ROSSMANN, M. G. RNA-dependent RNA polymerases from Flaviviridae. *Current opinion in structural biology*, v. 19, n. 6, p 746–751, 2009.

DIRKS, R. M.; PIERCE, N. A. A partition function algorithm for nucleic acid secondary structure including pseudoknots. *J Comput Chem*, v. 24, p. 1664-1677, 2003.

DIRKS, R. M.; PIERCE, N. A. An algorithm for computing nucleic acid base-pairing probabilities including pseudoknots. *J Comput Chem*, v. 25, p. 1295-1304, 2004.

DIRKS, R. M.; BOIS, J. S.; SCHAEFFER, J. M.; WINFREE, E.; PIERCE, N. A. Thermodynamic analysis of interacting nucleic acid strands. *SIAM Rev*, v. 49, p. 65-88, 2007.

DUFF, M.R.; CHEN, T.H.; HANCOCK, W.T.; *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*, v. 360, p. 2536-43, 2009.

ESPAH BORUJENI, A.; CHANNARASAPPA, A. S.; SALIS, H. M. Translation rate is controlled by coupled trade-offs between site accessibility, selective RNA unfolding and sliding at upstream standby sites. *Nucleic acids research*, v. 42, n. 4, p. 2646-2659, 2014.

ESPAH BORUJENI, A.; SALIS, H. M. Translation Initiation is Controlled by RNA Folding Kinetics via a Ribosome Drafting Mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, v. 138, n. 22, p. 7016-7023, 2016.

ESPAH BORUJENI, A.; CETNAR, D.; FARASAT, I.; SMITH, A.; LUNDGREN, N.; SALIS, H. M. Precise quantification of translation inhibition by mRNA structures that overlap with the ribosomal footprint in N-terminal coding sequences. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. 9, p. 5437-5448, 2017.

FUJII, H.; NODA, K.; ASAMI, Y.; KURODA, A.; SAKATA, M.; TOKIDA, A. Increase in bioluminescence intensity of firefly luciferase using genetic modification. *Analytical biochemistry*, v. 366, n. 2, p.131-136, 2007.

GARAMELLA, J.; MARSHALL, R.; RUSTAD, M.; NOIREAUX, V. The All-E. coli TX-TL Toolbox 2.0: A Platform for Cell-Free Synthetic Biology. *ACS synthetic biology*, v. 5, n. 4, p. 344-355, 2016.

GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; LEE, J. W.; ESSLETZBICHLER, P.; *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, v. 356, p. 438-442, 2017.

GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; KELLNER, M. J.; JOUNG, J.; COLLINS, J. J.; ZHANG, F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, v. 360, p. 439-444, 2018.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. *The Lancet*, v. 371, n. 9611, p. 500-509, 2008.

GUR, E.; SAUER, R.T. Evolution of the *ssrA* degradation tag in *Mycoplasma*: Specificity switch to a different protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, p. 16113-16118, 2008.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; *et al.* Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology*, v. 8, n. 12, p. 7–16, 2010. Supplement.

HALSTEAD, S. B.; ROJANASUPHOT, S.; SANGKAWIBHA, N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg*, v. 32, p. 154-156, 1983.

HUANG, D.; HOLTZ, W. J.; MAHARBIZ, M. M. A genetic bistable switch utilizing nonlinear protein degradation. **Journal of biological engineering**, v. 6, n. 1, p. 9, 2012.

IANNETTA, M.; LALLE, E.; MUSSO, M.; CARLETTI, *et al.* Persistent detection of dengue virus RNA in vaginal secretion of a woman returning from Sri Lanka to Italy, April 2017. **Euro surveillance**, v. 22, n. 34, p. 30600, 2017.

KASPRZYKOWSKI, J. I.; FUKUTANI, K. F.; FABIO, H.; FUKUTANI, E. R.; COSTA, L. C.; ANDRADE, B. B.; QUEIROZ, A. A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic?. **International journal of infectious diseases**: official publication of the International Society for Infectious Diseases, v. 96, p. 579–581, 2020.

KORHONEN, E.M.; HUHTAMO, E.; VIRTALA, A.M.; KANTELE, A.; VAPALAHTI, O. Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue. **J Clin Virol.**, v. 61, n. 3, p. 353-358, 2014.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALLE, E.; COLAVITA, F.; IANNETTA, M.; GEBREMESKEL TEKLE, S.; *et al.* Prolonged detection of dengue virus RNA in the semen of a man returning from Thailand to Italy, January 2018. **Euro surveillance**, v. 23, n. 18, p. 18-00197, 2018.

LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; VELEZ, J. O.; *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**, v. 14, p.1232-1239, 2008.

LIU, X.; SILVERMAN, A. D.; ALAM, K. K.; IVERSON, E.; LUCKS, J. B.; JEWETT, M. C.; RAMAN, S. Design of a Transcriptional Biosensor for the Portable, On-Demand Detection of Cyanuric Acid. **ACS synthetic biology**, v. 9, n. 1, p. 84-94, 2020.

MAIER, J.; MÖHRLE, R.; JELTSCH, A. Design of synthetic epigenetic circuits featuring memory effects and reversible switching based on DNA methylation. **Nature communications**, v. 8, p. 15336, 2017.

MARKLEY, A. L.; BEGEMANN, M. B.; CLARKE, R. E.; GORDON, G. C.; PFLEGER, B. F. Synthetic biology toolbox for controlling gene expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. **ACS synthetic biology**, v. 4, n. 5, p. 595-603, 2015.

MERRICK, C. A.; ZHAO J.; SUSAN J. R. Serine Integrases: Advancing Synthetic Biology. **ACS Synthetic Biology**, v. 7, n. 2, p. 299-310, 2018.

MOLTON, J. S; LOW, I.; JU CHOY, M. M.; KIM AW, P. P; *et al.* Dengue virus not detected in human semen. **Journal of Travel Medicine**, v. 25, n. 1, tay023, 2018.

MYHRVOLD, C.; FREIJE, C. A.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O; *et al.* Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. **Science**, New York, N.Y., v. 360, n. 6387, p. 444-448, 2018.

NUNES, M. L.; CARLINI, C. R.; MARINOWIC, D.; NETO, F. K.; *et al.* Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de pediatria**, v. 92, n. 3, p. 230-240, 2016.

ODUYEBO, T.; POLEN, K. D.; WALKE, H. T.; REAGAN-STEINER, S.; *et al.* Update: Interim guidance for healthcare providers caring for pregnant women with possible Zika virus exposure – United States (including U.S. Territories). **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, p. 781-793, 2017.

OKUNO, Y.; FUKUNAGA, T.; TADANO, M.; FUKAI, K.; IKEDA, T.; SEKII, K.; ARIYOSHI, H. Serological studies on volunteers inoculated experimentally with a dengue virus strain in 1943. **Biken journal**, v. 26, n. 4, p. 161-163, 1983.

OLIVEIRA MELO, A. S.; MALINGER, G.; XIMENES, R.; SZEJNFELD, P. O.; ALVES SAMPAIO, S.; BISPO DE FILIPPIS, A. M. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 47, n. 1, p. 6-7, 2016.

OLORUNNIJI, F. J.; ROSSER, S. J.; STARK, W. M. Site specific recombinases: molecular machines for the Genetic Revolution. **Biochem. J**, v. 473, p. 673-684, 2016.

OPS. Organización Panamericana de la Salud. **PLISA, Plataforma De Información En Salud Para Las Américas**. Washington, D.C. Disponível em: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue.html>. Acesso em: 10 de jun. de 2020.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological alert: neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. **Implications for public health in the Americas**. Washington, D.C.: PAHO, December 1st, 2015. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-dec-1-cha-epi-alert-zika-neuro-syndrome.pdf>. Acesso em: 16 de jun. 2020.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for patient care in the Region of the Americas**. 2nd. ed. Washington, D.C.: PAHO, 2016. ISBN 978-92-75-11890-0. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/31207/9789275118900-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 16 de jun. de 2020.

PAIVA, G. B. Desenvolvimento de sensores de RNA para identificação do vírus da Zika. Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli. 2018. 77 f. TCC (Graduação) – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

PARDEE, K.; GREEN, A. A.; FERRANTE, T.; CAMERON, D. E.; DALEYKEYSER, A.; YIN, P.; COLLINS, J. J. Paper-based synthetic gene networks. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 940-954, 2014.

PARDEE, K.; GREEN, A. A.; TAKAHASHI, M. K.; BRAFF, D.; *et al.* Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1255-1266, 2016.

PAZ-BAILEY, G.; ROSENBERG, E. S.; DOYLE, K.; MUNOZ-JORDAN, J.; *et al.* Persistence of Zika Virus in Body Fluids - Final Report. **The New England journal of medicine**, v. 379, n. 13, p. 1234-1243, 2017.

PLOURDE A. R.; BLOCH E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1185-1192, 2016.

PRINCE, H. E.; MATUD, J. L. Estimation of dengue virus IgM persistence using regression analysis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, p. 2183-2185, 2011.

RODRIGUES, S G; *et. al.* Epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon region and in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated prevalence of antibodies in horses. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 1, p. 81-86, 2010.

ROEHRIG, J. T.; HOMBACH, J.; BARRETT, A. D. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. **Viral immunology**, v. 21, n. 2, p. 123–132, 2008.

ROSS, W.; LANDY, A. Bacteriophage lambda int protein recognizes two classes of sequence in the phage att site: characterization of arm-type sites. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 79, n. 24, p. 7724-7728, 1982.

RUTHERFORD, K.; VAN DUYN, G. D. The ins and outs of serine integrase site-specific recombination. **Curr. Opin. Struct. Biol**, v. 24, p. 125-131, 2014.

SALLES, T. S.; DA ENCARNÇÃO SÁ-GUIMARÃES, T.; DE ALVARENGA, E. S. L; *et al.* (2018). **History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts**: a review. *Parasites Vectors*, v. 11, p. 264.

SIMMONS, C. P.; FARRAR, J. J.; VAN VINH CHAU, N.; WILLS, B. (2012). **Dengue**. *New England Journal of Medicine*, v. 366, p. 1423-1432.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. **World Health Organization**, 2009. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>. Acesso em: 16 de jun. 2020

ZADEH, J. N.; STEENBERG, C. D.; BOIS, J. S.; WOLFE, B. R.; PIERCE, M. B.; KHAN, A. R.; DIRKS, R. M.; PIERCE, N. A. NUPACK: analysis and design of nucleic acid systems. **J Comput Chem**, v. 32, p. 170-173, 2011.

ZOCCA, V. F. B. **Desenvolvimento de sensores de RNA para identificação dos vírus da dengue**. Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli. 2018. 82 f. TCC (Graduação) – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

Apêndice I – Resultado dos sequenciamentos

A	Seq_1	1981	GAATTCAGATAAAAAAATCCTTAGCTTCGCTAAGGATGATTCTGGAATTCGGCGCC	2040
	Seq_2	1	-----TTCGCGGCC	9
	Seq_1	2041	GCTTCTAGAGTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCACTAGATCCTCTAAC	2100
	Seq_2	10	GCTTCTAGAGTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCACTAGATCCTCTAAC	69
	Seq_1	2101	CGCTAGTCTGCTACCCCATGCGTACAGCTTGTATAGTTATGAACAGAGGAGACATAATA	2160
	Seq_2	70	CGCTAGTCTGCTACCCCATGCGTACAGCTTGTATAGTTATGAACAGAGGAGACATAATA	129
	Seq_1	2161	TGACTAAGCTGTACGCGAGTCGAC-----CTGGCGGCAGCGCAAAAGAGTAAAAAA	2211
	Seq_2	130	TGACTAAGCTGTACGCGAGTCGACTCGATCGACCTGGCGGCAGCGCAAAAGAGTAAAAAA	189
	Seq_1	2212	TAAACTACCTATTTTCCAAATACGCGGTTCAATTTATGTTCTCTGGAATTAAGAGAAAT	2271
	Seq_2	190	TAAACTACCTATTTTCCAAATACGCGGTTCAATTTATGTTCTCTGGAATTAAGAGAAAT	249
B	Seq_1	2272	TAGAAGTTGGAAGAAAAACACATTAGCGAGCGTTAATTATGCGATTAAAAATTCAAATA	2331
	Seq_2	250	TAGAAGTTGGAAGAAAAACACATTAGCGAGCGTTAATTATGCGATTAAAAATTCAAATA	309
	Seq_1	2332	ATCAAATGATCGCAATACCGCAGATTGATGCATCTGTTGAAAAACCTGAATTTTCAGATT	2391
	Seq_2	310	ATCAAATGATCGCAATACCGCAGATTGATGCATCTGTTGAAAAACCTGAATTTTCAGATT	369
	Seq_1	2392	TACATGAATTTGGAATTTTAATTGATTTTGAAGTAATCAAGAATGGAAGATAATTCAT	2451
	Seq_2	370	TACATGAATTTGGAATTTTAATTGATTTTGAAGTAATCAAGAATGGAAGATAATTCAT	429
	Seq_1	2452	TAACATATTAGCACAAACCTATTCAACGATGTAAAGTAATTAGCTTTTTTGAAAAATGAAG	2511
	Seq_2	430	TAACATATTAGCACAAACCTATTCAACGATGTAAAGTAATTAGCTTTTTTGAAAAATGAAG	489
	Seq_1	4081	TAAGTTTATACCTCGGTAAAGGAAATTTAATTCCTACAGGTAACTTGGTGAAATTATGA	4140
	Seq_2	608	TAAGTTTATACCTCGGTAAAGGAAATTTAATTCCTACAGGTAACTTGGTGAAATTATGA	549
	Seq_1	4141	AAGAATCTGCAACAATTGCGTTAACTTATGTTAAATCAAACCTTGAAAAATTTGGAGTAG	4200
	Seq_2	548	AAGAATCTGCAACAATTGCGTTAACTTATGTTAAATCAAACCTTGAAAAATTTGGAGTAG	489
	Seq_1	4201	ATAAAAAAGTATTTGAAGAAAAATGATATTCATGTTACGTTCTGGAAGAGCTGTTCCAA	4260
	Seq_2	488	ATAAAAAAGTATTTGAAGAAAAATGATATTCATGTTACGTTCTGGAAGAGCTGTTCCAA	429
	Seq_1	4261	AAGATGGACCAAGTGCTGGTATCACAATTACAACTGCTTTAATTTCTGCACTTTCAGATA	4320
	Seq_2	428	AAGATGGACCAAGTGCTGGTATCACAATTACAACTGCTTTAATTTCTGCACTTTCAGATA	369
	Seq_1	4321	AACCAGTTTCAAAGAAATTTGGAATGACTGGTGAAATCACACTAAGAGGAAATGTATTGC	4380
	Seq_2	368	AACCAGTTTCAAAGAAATTTGGAATGACTGGTGAAATCACACTAAGAGGAAATGTATTGC	309
	Seq_1	4381	CAATTGGTGGATTAAGAGAAAAATCAATTTCTGCTTCAAGAAGTGGATTGAAAAACAATCA	4440
	Seq_2	308	CAATTGGTGGATTAAGAGAAAAATCAATTTCTGCTTCAAGAAGTGGATTGAAAAACAATCA	249
	Seq_1	4441	TTATTTCAAAGAAAAATGAAAGAGACTTAGACGAAATTCAGATGAAGTAAAGCAAAC	4500
	Seq_2	248	TTATTTCAAAGAAAAATGAAAGAGACTTAGACGAAATTCAGATGAAGTAAAGCAAAC	189
	Seq_1	4501	TAAAAATTATACCTGCTGAAAAATATGAAGAGGTATTGCAATAGTTTTTAAACAAAAT	4560
	Seq_2	188	TAAAAATTATACCTGCTGAAAAATATGAAGAGGTATTGCAATAGTTTTTAAACAAAAT	129
	Seq_1	4561	AAGACGTCCTGAGTAGGACAAATCCGCGCTCTAGCTAAGCAGAAGGCCATCTGACGG	4620
	Seq_2	128	AAGACGTCCTGAGTAGGACAAATCCGCGCTCTAGCTAAGCAGAAGGCCATCTGACGG	69
	Seq_1	4621	ATGGCCTTTTTCGGTTTCTACAAAC-TCTTGTGGGTACTAGTAGCGGCCGCTGCA----	4675
	Seq_2	68	ATGGCCTTTTTCGGT-AAC-ACATACATCTTGTGGGTACTAGTAGCGGCCGCTGCACTCC	11

Figura A1 – Resultado de sequenciamento da construção pSB1C3_DENV10550Switch2_mf-Lon. (A) resultado *primer forward* (B) resultado *primer reverse*. São destacados, na ordem, as sequências nucleicas do BB prefixo (roxo), do *switch* DENV10550(2) (rosa) e o códon inicial (laranja) presente neste, do *linker* (azul), parte inicial e final do gene mf-lon (roxo-claro) e do terminador T1 (cinza) e do BB sufixo (roxo). Fonte: Próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*

A	Seq_1	1981	GAATTCAGATAAAAAATCCTTAGCTTTCGCTAAGGATGATTCTGGAATTCGCGGCC	2040
	Seq_2	1	-----TGATTCTGG-ATTCGCGGCC	20
	Seq_1	2041	GCTTCTAGAGTAATACGACTCACTATAGGGATAAAGGAGTAATAATGAGTAAAAAAT	2100
	Seq_2	21	GCTTCTAGAGTAATACGACTCACTATAGGGATAAAGGAGTAATAATGAGTAAAAAAT	80
	Seq_1	2101	AAACTACCTATTTTCCAAATACGCGGTTCAATTATTGTTCTCTGGAATTAAGAGAATT	2160
	Seq_2	81	AAACTACCTATTTTCCAAATACGCGGTTCAATTATTGTTCTCTGGAATTAAGAGAATT	140
	Seq_1	2161	AGAAGTTGGAAGAAAAACACATTAGCGAGCGTTAATTATGCGATTAAAAATCAAATA	2220
	Seq_2	141	AGAAGTTGGAAGAAAAACACATTAGCGAGCGTTAATTATGCGATTAAAAATCAAATA	200
	Seq_1	2221	TCAAATGATCGCAATACCGAGATTGATGCATCTGTTGAAAAACCTGAATTTTCAGATT	2280
	Seq_2	201	TCAAATGATCGCAATACCGAGATTGATGCATCTGTTGAAAAACCTGAATTTTCAGATT	260
	Seq_1	2281	ACATGAATTTGGAATTTTAATTGATTTTGAAGTAATCAAAGAATGGAAGATAATTCATT	2340
	Seq_2	261	ACATGAATTTGGAATTTTAATTGATTTTGAAGTAATCAAAGAATGGAAGATAATTCATT	320
	Seq_1	2341	AACATTAGCACAAACCTTATCAACGATGTAAGTAATTAGCTTTTTGAAAAATGAAGA	2400
	Seq_2	321	AACATTAGCACAAACCTTATCAACGATGTAAGTAATTAGCTTTTTGAAAAATGAAGA	380
	Seq_1	2401	TCAAGTCCGTATGCGGAAGTTGAATTAATTGAATCAATTAATGATTTTAGTGATGAAGA	2460
	Seq_2	381	TCAAGTCCGTATGCGGAAGTTGAATTAATTGAATCAATTAATGATTTTAGTGATGAAGA	440
	Seq_1	2461	GTTAAAAAATTAATTGAAAAATCTCTGATGCTATCAAACTAAAGCTAGTTTAGTAAC	2520
	Seq_2	441	GTTAAAAAATTAATTGAAAAATCTCTGATGCTATCAAACTAAAGCTAGTTTAGTAAC	500
	Seq_1	2521	AAAACAAATTAACAGTTAATATCAGGTGAATCTGATGATTTAAGTTTAGCTTTTGATT	2580
	Seq_2	501	AAAACAAATTAACAGTTAATATCAGGTGAATCTGATGATTTAAGTTTAGCTTTTGATT	560
	Seq_1	2581	AATTATGTTTAACTGGCTCCGTCAAAAATATTGACAAATCCGGAATACATAACATCTCC	2640
	Seq_2	561	AATTATGTTTAACTGGCTCCGTCAAAAATATTGACAAATCCGGAATACATAACATCTCC	620
B	Seq_1	3960	CAATTGAAGTAAGTTTATACCTGGTAAAGGAAATTTAATTCTTACAGGTAACTTGGTG	4019
	Seq_2	610	CAATTGAAGTAAGTTTATACCTGGTAAAGGAAATTTAATTCTTACAGGTAACTTGGTG	551
	Seq_1	4020	AAGTTATGAAAGAATCTGCAACAAATGCGTTAACTTATGTTAAATCAAACCTTGAAAAAT	4079
	Seq_2	550	AAGTTATGAAAGAATCTGCAACAAATGCGTTAACTTATGTTAAATCAAACCTTGAAAAAT	491
	Seq_1	4080	TTGGAGTAGATAAAAAAGTATTGAAGAAAATGATATTCATGTTACGTTCTGAGAGGAG	4139
	Seq_2	490	TTGGAGTAGATAAAAAAGTATTGAAGAAAATGATATTCATGTTACGTTCTGAGAGGAG	431
	Seq_1	4140	CTGTTCCAAAAGATGGACCAAGTGGTATCACAATTACAACCTGCTTAATTTCTGCAC	4199
	Seq_2	430	CTGTTCCAAAAGATGGACCAAGTGGTATCACAATTACAACCTGCTTAATTTCTGCAC	371
	Seq_1	4200	TTTCAGATAAACAGTTTCAAAGAAATTTGGAATGACTGGTGAAATCACACTAAGAGGAA	4259
	Seq_2	370	TTTCAGATAAACAGTTTCAAAGAAATTTGGAATGACTGGTGAAATCACACTAAGAGGAA	311
	Seq_1	4260	ATGTATTGCCAATTGGTGGATTAAAGAGAAAATCAATTTCTGCTTCAAGAGTGGATTGA	4319
	Seq_2	310	ATGTATTGCCAATTGGTGGATTAAAGAGAAAATCAATTTCTGCTTCAAGAGTGGATTGA	251
	Seq_1	4320	AAACAATCATTATTCCAAAGAAAAATGAAAGAGACTTAGACGAAATCCAGATGAAGTAA	4379
	Seq_2	250	AAACAATCATTATTCCAAAGAAAAATGAAAGAGACTTAGACGAAATCCAGATGAAGTAA	191
	Seq_1	4380	AAGCAAACTAAAAATTATACCTGCTGAAAAATATGAAGAGGTATTGCAATAGTTTTTA	4439
	Seq_2	190	AAGCAAACTAAAAATTATACCTGCTGAAAAATATGAAGAGGTATTGCAATAGTTTTTA	131
	Seq_1	4440	AAACAAAATAAGACGTCCCTGAGTAGGACAAATCCGCGCTCTAGCTAAGCAGAAGGCCA	4499
	Seq_2	130	AAACAAAATAAGACGTCCCTGAGTAGGACAAATCCGCGCTCTAGCTAAGCAGAAGGCCA	71
	Seq_1	4500	TCCTGACGGATGGCCTTTTTCGCTTCTACAACTCTTGTGGGGATCCGCTGCA----	4555
	Seq_2	70	TCCTGACGGATGGCCTTTTTCGCTTCTACAACTCTTGTGGGGATCCGCTGCACTCC	11

Figura A2 - Resultado de sequenciamento da construção pSB1C3_Pt7_mf-lon. (A) resultado *primer forward* (B) resultado *primer reverse*. São destacados, na ordem, as sequências nucleicas do BB prefixo (verde-claro), do promotor T7 (azul), do RBS (roxo), parte inicial e final do gene mf-lon (laranja) e do terminador T1 (cinza). Fonte: Próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*

A	Seq_1	1981	GAATTCAGATAAAAAAATCCTTAGCTTTCGCTAAGGATGATTTCTGGAATTCGCGGCC	2040
	Seq_2	1	-----TTTCTGGAATTCGCGGCC	18
	Seq_1	2041	GCTTCTAGAGTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCTTTCGCTCTATTCTC	2100
	Seq_2	19	GCTTCTAGAGTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCTTTCGCTCTATTCTC	78
	Seq_1	2101	ATCAGTTTCATGTCCTGTGTCGGTCTTTAGAACAGAGGAGATAAAGATGGACACAGGACA	2160
	Seq_2	79	ATCAGTTTCATGTCCTGTGTCGGTCTTTAGAACAGAGGAGATAAAGATGGACACAGGACA	138
	Seq_1	2161	CAAGCTCGAGGCAGCGCAAAAGAGTAAAAAATAAACTACCTATTTTCCAAATACGCGG	2220
	Seq_2	139	CAAGCTCGAGGCAGCGCAAAAGAGTAAAAAATAAACTACCTATTTTCCAAATACGCGG	198
	Seq_1	2221	TTCATTATTGTTCTCGGAATTAAAGAGAATTTAGAAGTTGGAAGAAAAACACATTAGC	2280
	Seq_2	199	TTCATTATTGTTCTCGGAATTAAAGAGAATTTAGAAGTTGGAAGAAAAACACATTAGC	258
	Seq_1	2281	GAGCGTTAATTATGCGATTAAAAATTCAAATAATCAAATGATCGCAATACCGCAGATTGA	2340
	Seq_2	259	GAGCGTTAATTATGCGATTAAAAATTCAAATAATCAAATGATCGCAATACCGCAGATTGA	318
	Seq_1	2341	TGCATCTGTTGAAAAACCTGAATTTTCAGATTACATGAATTTGGAATTTTAATTGATT	2400
	Seq_2	319	TGCATCTGTTGAAAAACCTGAATTTTCAGATTACATGAATTTGGAATTTTAATTGATT	378
B	Seq_1	2401	TGAAGTAATCAAAGAATGGAAGATAATTCATTAACATTAGCACAAACCTATTCAACG	2460
	Seq_2	379	TGAAGTAATCAAAGAATGGAAGATAATTCATTAACATTAGCACAAACCTATTCAACG	438
	Seq_1	2461	ATGTAAAGTAATTAGCTTTTGGAAAATGAAGATCAAGTGCCGTATGCGGAAGTTGAATT	2520
	Seq_2	439	ATGTAAAGTAATTAGCTTTTGGAAAATGAAGATCAAGTGCCGTATGCGGAAGTTGAATT	498
	Seq_1	533	CGTTAACTTATGTTAAATCAAACCTTGGAAAATTTGGAGTAGATAAAAAAGTATTGAAG	474
	Seq_2	4140	CGTTAACTTATGTTAAATCAAACCTTGGAAAATTTGGAGTAGATAAAAAAGTATTGAAG	4199
	Seq_1	473	AAAATGATATTCATGTTACGTTCTGAAGGAGCTGTTCCAAAAGATGGACCAAGTGCTG	414
	Seq_2	4200	AAAATGATATTCATGTTACGTTCTGAAGGAGCTGTTCCAAAAGATGGACCAAGTGCTG	4259
	Seq_1	413	GTATCACAAATACAACCTGCTTTAATTTCTGCACCTTCAGATAAACAGTTTCAAAGAAA	354
	Seq_2	4260	GTATCACAAATACAACCTGCTTTAATTTCTGCACCTTCAGATAAACAGTTTCAAAGAAA	4319
	Seq_1	353	TTGGAATGACTGGTGAAATCACACTAAGAGGAAATGTATTGCCAATTGGTGGATTAGAG	294
	Seq_2	4320	TTGGAATGACTGGTGAAATCACACTAAGAGGAAATGTATTGCCAATTGGTGGATTAGAG	4379
	Seq_1	293	AAAAATCAATTTCTGCTTCAAGAAGTGGATTGAAAACAATCATTATTCCAAAGAAAAATG	234
	Seq_2	4380	AAAAATCAATTTCTGCTTCAAGAAGTGGATTGAAAACAATCATTATTCCAAAGAAAAATG	4439
	Seq_1	233	AAAGAGACTTAGACGAAATTCAGATGAAGTAAAGCAAACTAAAAATTATACCTGCTG	174
	Seq_2	4440	AAAGAGACTTAGACGAAATTCAGATGAAGTAAAGCAAACTAAAAATTATACCTGCTG	4499
	Seq_1	173	AAAAATATGAAGAGGTATTGCAATAGTTTTTAAACAAAATAAGACGTCCTGAGTAGG	114
	Seq_2	4500	AAAAATATGAAGAGGTATTGCAATAGTTTTTAAACAAAATAAGACGTCCTGAGTAGG	4559
	Seq_1	113	ACAAATCCGCCGCTCTAGCTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTCGTTTTT	54
	Seq_2	4560	ACAAATCCGCCGCTCTAGCTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTCGTTTTT	4619
	Seq_1	53	TACAAACTCTTGTGGGTACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAAAAGGG	1
	Seq_2	4620	TACAAACTCTTGTGGGTACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAAAAGGG	4656

Figura A3 - Resultado de sequenciamento da construção pSB1C3_ZIKV1440Switch2.6_mf-lon. (A) resultado *primer forward* (B) resultado *primer reverse*. São destacados, na ordem, as sequências nucleicas do BB prefixo (roxo), do *switch* ZIKV1440(2.6) (azul), do *linker* (rosa), parte inicial e final do gene mf-lon (verde), do terminador T1 (cinza) e do BB sufixo (roxo).
Fonte: Próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*

A	Seq_1	1981	GAATTCAGATAAAAAATCCCTAGCTTCGCTAAGGATGATTTCTGSAATTCGGGGCC	2040
	Seq_2	12	-----CGGGGCC	18
	Seq_1	2041	GCCTCTAGAGTTGACAGCTAGCTCAGTCTAGGTATAATGCTAGCACTAGATCCTCTAAC	2100
	Seq_2	19	GCCTCTAGAGTTGACAGCTAGCTTAAACCTGGGTATAATGCTAGCACTAGATCCTCTAAC	78
	Seq_1	2101	CGCTAGTCTGCTACCCCATGCGTACAGCTTGTATAGTTATGAACAGAGGAGACATAATA	2160
	Seq_2	79	CGCTAGTCTGCTACCCCATGCGTACAGCTTGTATAGTTATGAACAGAGGAGACATAATA	138
	Seq_1	2161	TGACTAAGCTGTACGCACTGACTCGACGGCAGCGCAAAAGAACACGATTAAACATCGCTA	2220
	Seq_2	139	TGACTAAGCTGTACGCACTGACTCGACGGCAGCGCAAAAGAACACGATTAAACATCGCTA	198
	Seq_1	2221	AGAAGCACTTCTCTGACATCGAAGTGGCTGCTATCCCGTTCAACACTCTGGCTGACCAAT	2280
	Seq_2	199	AGAAGCACTTCTCTGACATCGAAGTGGCTGCTATCCCGTTCAACACTCTGGCTGACCAAT	258
	Seq_1	2281	ACGGTGAGCGTTTAGCTCGCGAACAGTTGGCCCTTGAGCATGAGTCTTACGAGATGGGTG	2340
	Seq_2	259	ACGGTGAGCGTTTAGCTCGCGAACAGTTGGCCCTTGAGCATGAGTCTTACGAGATGGGTG	318
	Seq_1	2341	AAGCACGCTTCGCAAGATGTTTGAGCGTCAACTTAAAGCTGGTGAGGTTGCGGATAACG	2400
	Seq_2	319	AAGCACGCTTCGCAAGATGTTTGAGCGTCAACTTAAAGCTGGTGAGGTTGCGGATAACG	378
	Seq_1	2401	CTGCGGCCAAGCCTCTCATCACTACCTACTCCCTAAGATGATTGACGCACTCAACGACT	2460
	Seq_2	379	CTGCGGCCAAGCCTCTCATCACTACCTACTCCCTAAGATGATTGACGCACTCAACGACT	438
	Seq_1	2461	GGTTTGAGGAAGTAAAGCTAAGCGCGCAAGCGCCGACAGCCTTCCAGTTCTGCAAG	2520
	Seq_2	439	GGTTTGAGGAAGTAAAGCTAAGCGCGCAAGCGCCGACAGCCTTCCAGTTCTGCAAG	498
	Seq_1	2521	AAATCAAGCCGGAAGCCGTAGCGTACATCACCATTAAAGACCACTCTGGCTTGCTAAACA	2580
	Seq_2	499	AAATCAAGCCGGAAGCCGTAGCGTACATCACCATTAAAGACCACTCTGGCTTGCTAAACA	558
	Seq_1	2581	GTGCTGACAATACAACCGTTCCAGGCTGTAGCAAGCGCAATCGGTGGGGCC-ATTGAGGAC	2639
	Seq_2	559	GTGCTGACAATACAACCGTTCCAGGCTGTAGCAAGCGCAATCGGTGGGGCCATTGAGGAC	618
B	Seq_1	4441	ACCTGATGTTCTCGGTGAGTTCGGCTTACAGCCTACCAITTAACACCAAAAGATAGCG	4500
	Seq_2	521	ACCTGATGTTCTCGGTGAGTTCGGCTTACAGCCTACCAITTAACACCAAAAGATAGCG	462
	Seq_1	4501	AGATTGATGCACACAAACAGGAGTCTGGTATCGCTCCTAACTTTGTACACAGCCAAGACG	4560
	Seq_2	461	AGATTGATGCACACAAACAGGAGTCTGGTATCGCTCCTAACTTTGTACACAGCCAAGACG	402
	Seq_1	4561	GTAGCCACCTTCGTAAGACTGTAGTGTGGGCACACGAGAAGTACGGAATCGAATCTTTTG	4620
	Seq_2	401	GTAGCCACCTTCGTAAGACTGTAGTGTGGGCACACGAGAAGTACGGAATCGAATCTTTTG	342
	Seq_1	4621	CAGTGAATCAGACTCCTTCGGTACCAITTCGGCTGACGCTGCGAACCTGTTCAAGCAG	4680
	Seq_2	341	CAGTGAATCAGACTCCTTCGGTACCAITTCGGCTGACGCTGCGAACCTGTTCAAGCAG	282
	Seq_1	4681	TGCGCGAAACTATGGTTGACACATATGAGTCTTGTGATGTAAGTGTGATTTCTACGACC	4740
	Seq_2	281	TGCGCGAAACTATGGTTGACACATATGAGTCTTGTGATGTAAGTGTGATTTCTACGACC	222
	Seq_1	4741	AGTTGCTGACCAAGTTGCACGAGTCTCAATTGGACAAAATGCCAGCACTTCGGGCTAAG	4800
	Seq_2	221	AGTTGCTGACCAAGTTGCACGAGTCTCAATTGGACAAAATGCCAGCACTTCGGGCTAAG	162
	Seq_1	4801	GTAACCTGAACTCCGTGACATCTTAGAGTCGGACTTCGGGTTTCGGTAATAACAGGCA	4860
	Seq_2	161	GTAACCTGAACTCCGTGACATCTTAGAGTCGGACTTCGGGTTTCGGTAATAACAGGCA	102
	Seq_1	4861	TCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTCGTTTTATCTGTTGTTTC	4920
	Seq_2	101	TCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTCGTTTTATCTGTTGTTTC	43
	Seq_1	4921	GGTGAACGCTCTCTACTAGTAGCGGCCGCTGCA-----	4953
	Seq_2	42	GGTGAACGCTCTCTACTAGTAGCGGCCGCTGCA-----	1

Figura A4 - Resultado de sequenciamento da construção pSB1C3_DENV10550Switch2_T7RNApol. (A) resultado *primer foward* (B) resultado *primer reverse*. Destacado, na ordem, as sequências nucleicas do BB prefixo (roxo), do promotor J23119 (vermelho), do *switch* DENV10550(2) (azul), do início do *linker* (rosa), parte inicial e final do gene T7 RNA pol (verde) e do terminador rrnBT1 (marrom). Fonte: Próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*.

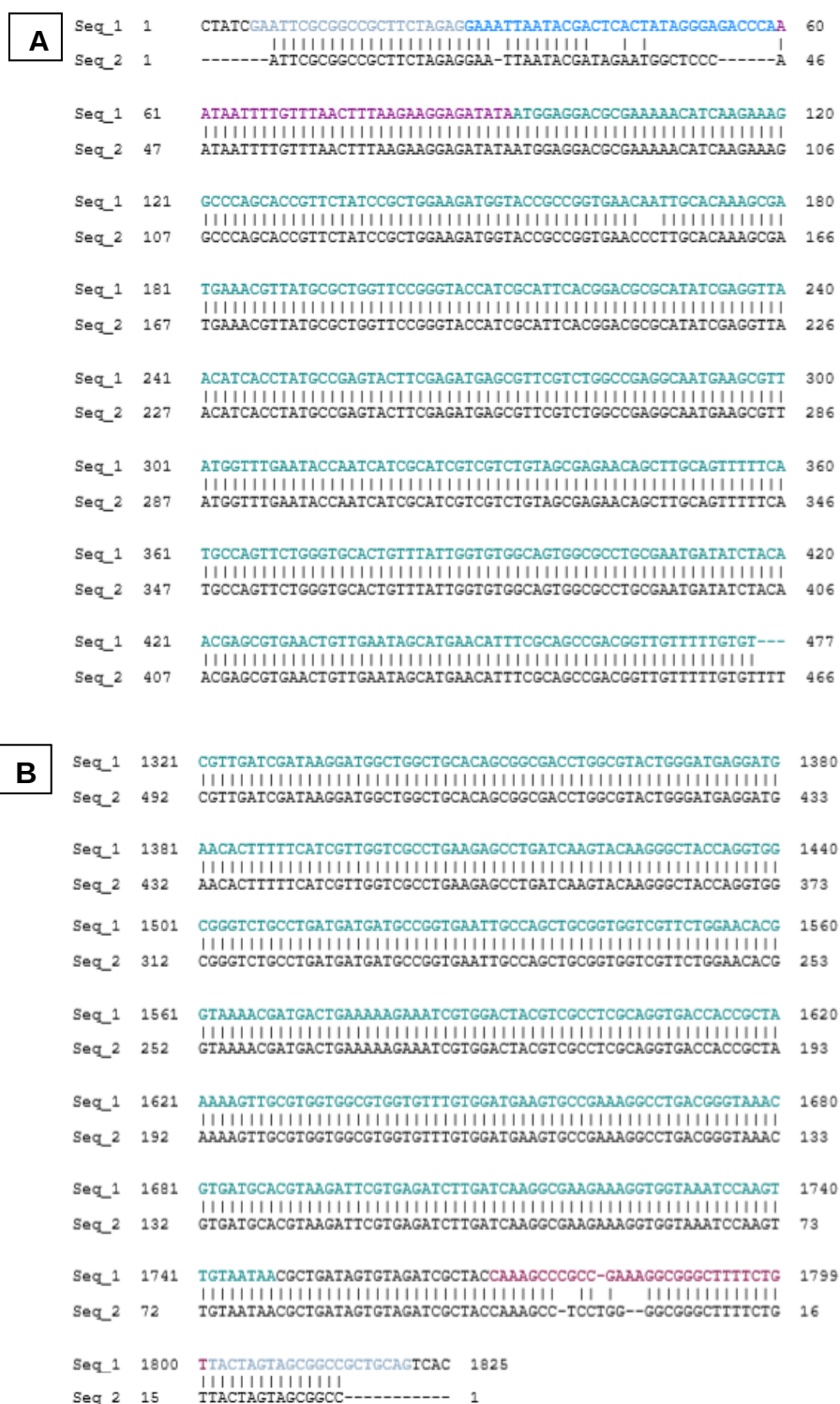


Figura A5 - Alinhamento do sequenciamento da construção pSB1C3_PT7-EPICluc. (A) resultado *primer forward*, *missmatch* na sequência do promotor T7 (em azul) são devido à baixa confiabilidade do sequenciamento nesta parte (baixo QV) (B) resultado *primer reverse*. São destacados, na ordem, as sequências nucleicas do BB prefixo (cinza), do promotor T7 (azul), parte inicial e final do gene EPIC luc (verde) e do terminador T1 (vinho) e do BB sufixo (cinza). Fonte: Próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*.

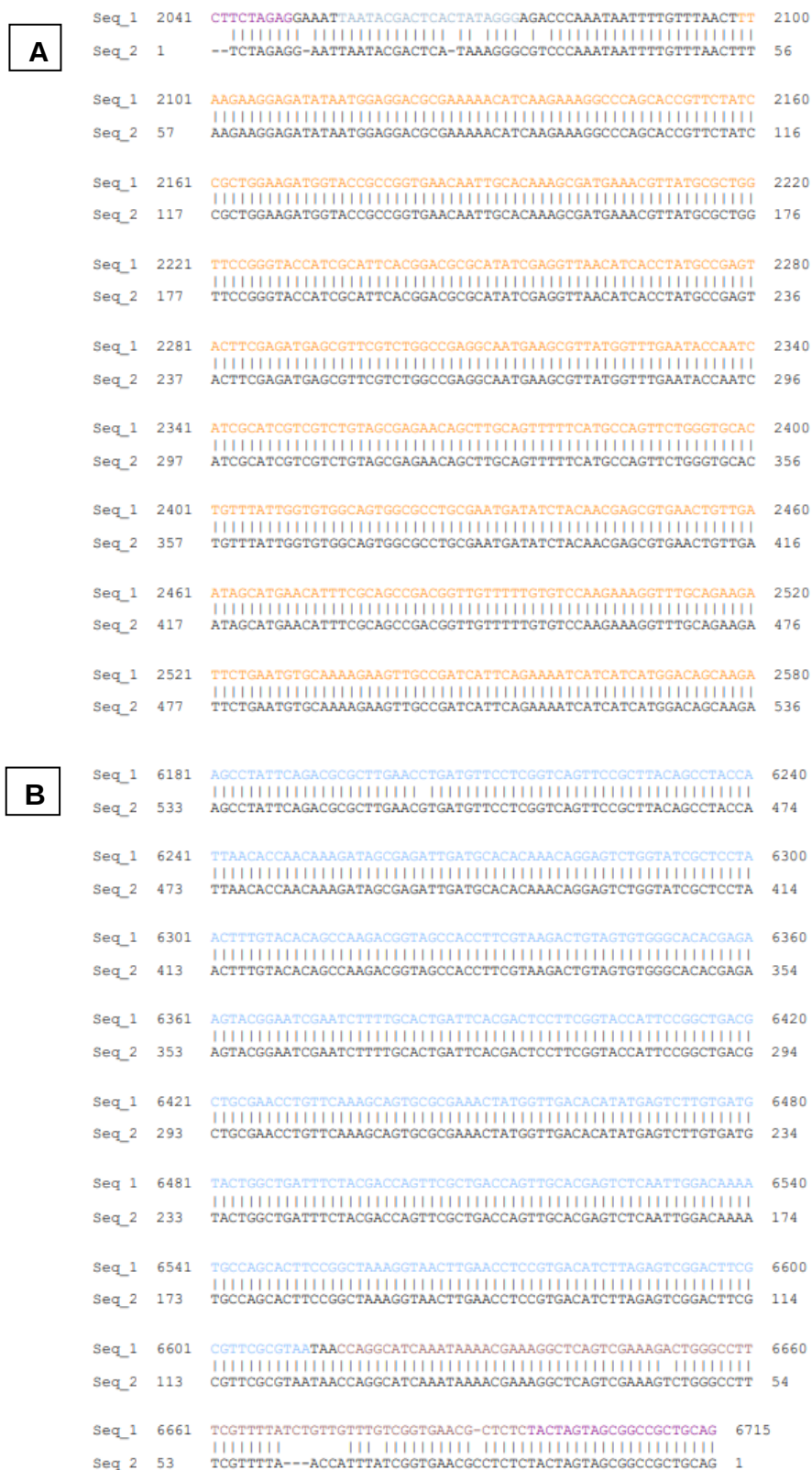


Figura A6 - Alinhamento do sequenciamento da construção pSB1C3_EPICluc_ZIKV1440Switch2.6_T7RNApol. (A) resultado *primer forward*; (B) resultado *primer reverse*. São destacados, na ordem, parte da sequência nucleica do BB prefixo (roxo), do promotor T7 (cinza), a parte inicial do gene da EPIC luc (laranja), parte final do gene da T7 RNApol (azul-claro) e do terminador rrnBT1 (marrom) e do BB sufixo (roxo). Fonte: Próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*

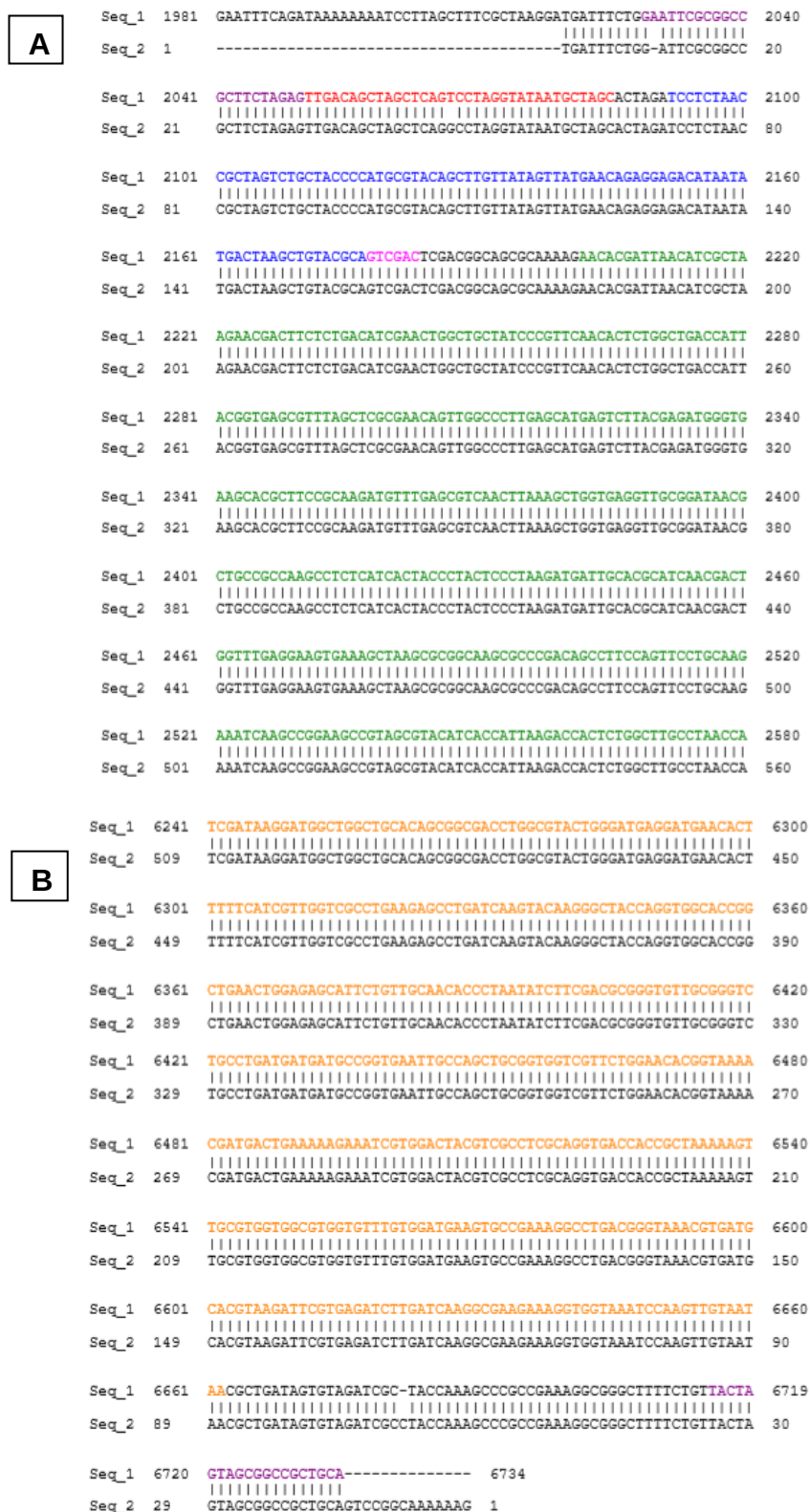


Figura A7 - Alinhamento do sequenciamento da construção pSB1C3_DENV10550Switch2_T7RNAPol_EPICluc. (A) resultado *primer forward* (B) resultado *primer reverse*. São destacados, na ordem, as sequências nucleicas do BB prefixo (roxo), do promotor J23119 (vermelho), do *switch* DENV10550(2) (azul), do início do *linker* (rosa), parte inicial do gene da T7 RNAPol (verde), a parte final do gene da EPICluc (laranja) e do BB sufixo (roxo). Fonte: Próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*.

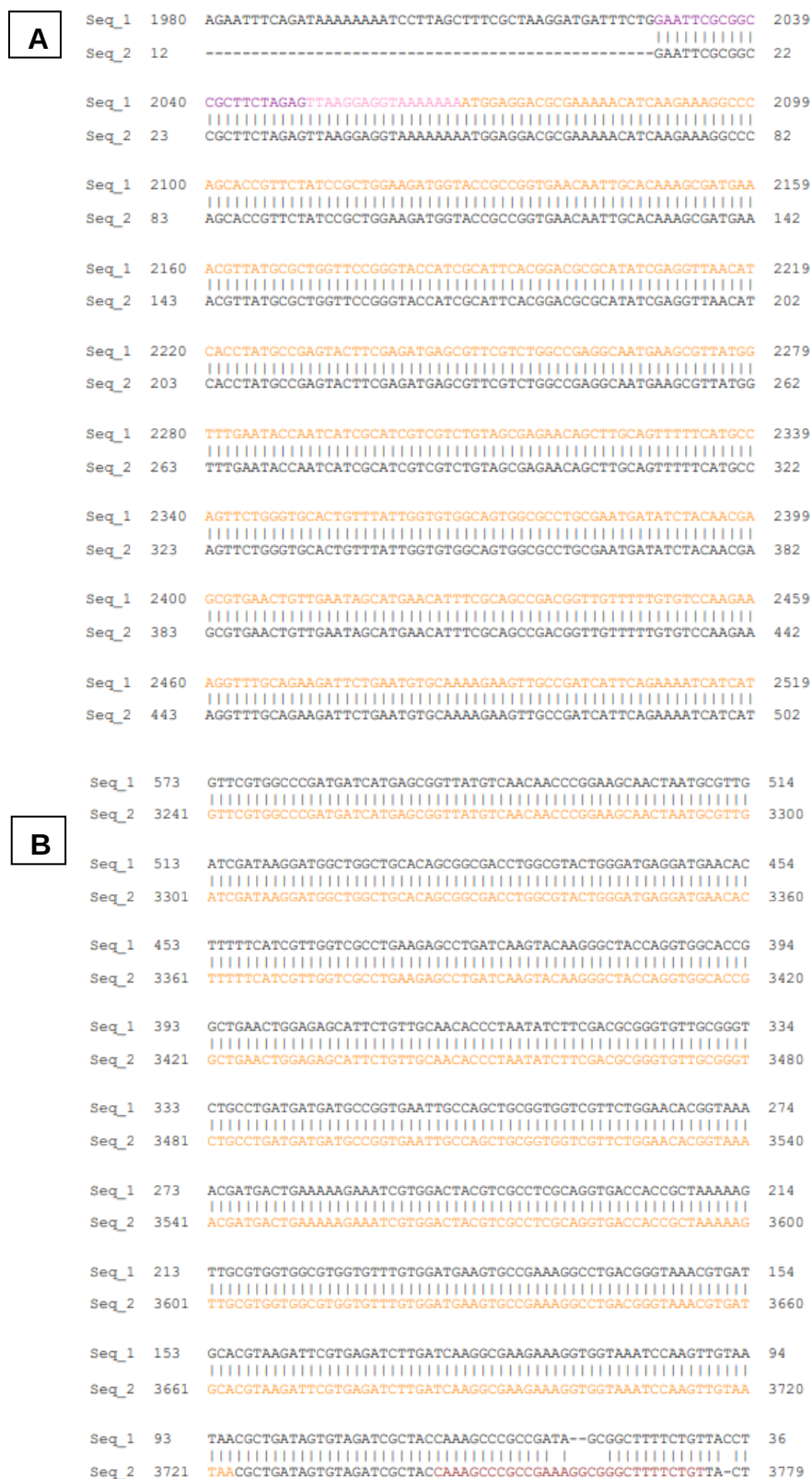


Figura A8 - Alinhamento do sequenciamento da construção pSB1C3_RBS-EPICluc. (A) resultado *primer forward* (B) resultado *primer reverse*. São destacados, na ordem, o BB prefixo (roxo), a sequência contendo o RBS (rosa) a parte inicial e final do gene da luciferase EPICluc (laranja) e o terminador T500 (marrom). Fonte: Próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*.

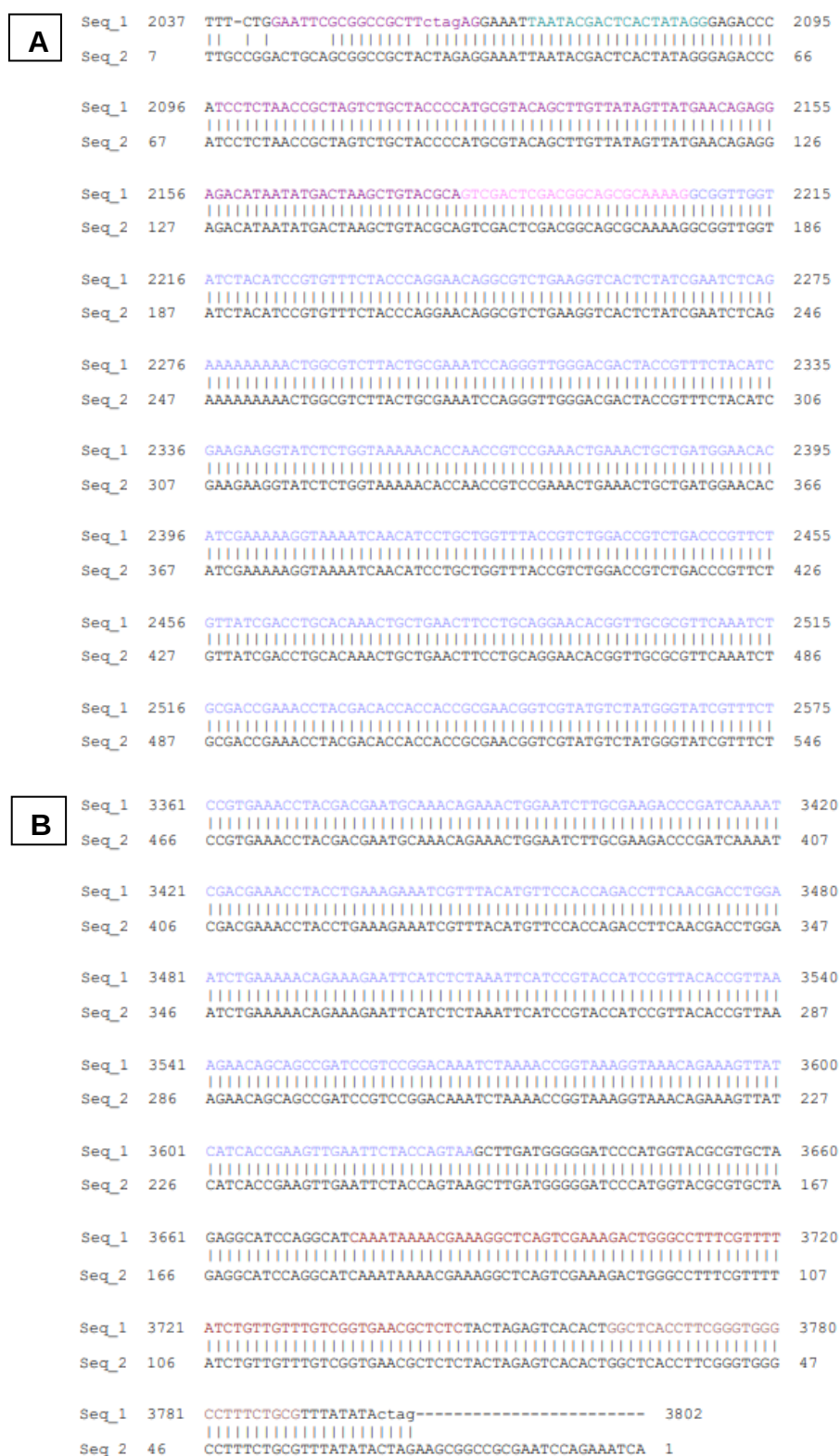


Figura A9 -Alinhamento do sequenciamento da construção pSB1C3_SwDENV_Int13. (A) resultado *primer forward* (B) resultado *primer reverse*. São destacados, na ordem, em (A) a sequência do BBprefixo, do promotor T7 (verde), do switch DENV10550(2) (roxo), do linker (rosa) e o início do gene da int13 (azul-claro); em (B) destaca-se o final do gene int13, do terminador rrnB T1 (vinho) e do terminador T7Te (marrom). Fonte: Próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*.

A	Seq_1	2037	GGCCGCTTCTAGAGGAAATTAATACGACTCAGCTATAGGGAGACCCATCCTCTAACCGCTA	2096
	Seq_2	20	GGCCGCTACTAGAGGAAATTAATACGACTCAGCTATAGGGAGACCCATCCTCTAACCGCTA	79
	Seq_1	2097	GTCTGCTACCCCATGCGTACAGCTTGTATAGTTATGAACAGAGGAGACATAATATGACT	2156
	Seq_2	80	GTCTGCTACCCCATGCGTACAGCTTGTATAGTTATGAACAGAGGAGACATAATATGACT	139
	Seq_1	2157	AAGCTGTACGCACTCGACTCGACGGCAGCGCAAAAGAAAGTTGCGATCTACACCCGTGTT	2216
	Seq_2	140	AAGCTGTACGCACTCGACTCGACGGCAGCGCAAAAGAAAGTTGCGATCTACACCCGTGTT	199
	Seq_1	2217	TCTACCCCTGGAACAGAAAGAAAAAGGTCACTCTATCGAAGAACAGGAACGTAAACTGCGT	2276
	Seq_2	200	TCTACCCCTGGAACAGAAAGAAAAAGGTCACTCTATCGAAGAACAGGAACGTAAACTGCGT	259
	Seq_1	2277	GCGTACTCTGACATCAACGACTGGAATAATCCACAAAGTTTACACCGACGCGGGTTACTCT	2336
	Seq_2	260	GCGTACTCTGACATCAACGACTGGAATAATCCACAAAGTTTACACCGACGCGGGTTACTCT	319
B	Seq_1	2337	GGTGCAGAAAAAGACCGTCCGCGCTGCAGGAAATGCTGAACGAAATCGACAACCTTCGAC	2396
	Seq_2	320	GGTGCAGAAAAAGACCGTCCGCGCTGCAGGAAATGCTGAACGAAATCGACAACCTTCGAC	379
	Seq_1	2397	CTGGTTCTGGTTTACAAACTGGACCGTCTGACCCGTCTGTTAAAGACCTGCTGGAAATC	2456
	Seq_2	380	CTGGTTCTGGTTTACAAACTGGACCGTCTGACCCGTCTGTTAAAGACCTGCTGGAAATC	439
	Seq_1	3361	AAAAACGTAAAGACAACGACAAAGGTAAACCTTCAACTACGAAAAATCAAAAACTTCA	3420
	Seq_2	413	AAAAACGTAAAGACAACGACAAAGGTAAACCTTCAACTACGAAAAATCAAAAACTTCA	354
	Seq_1	3421	AATACTCTCTGCTGAACGGTTGGGAAGTATGGAAGACGAACTGAAAACCGAATTCATCA	3480
	Seq_2	353	AATACTCTCTGCTGAACGGTTGGGAAGTATGGAAGACGAACTGAAAACCGAATTCATCA	294
	Seq_1	3481	AAATGGCGATCAAAAAATCCACTTCGAATACGTTAAAGGTATCAAAGGTAAACGTCAGA	3540
	Seq_2	293	AAATGGCGATCAAAAAATCCACTTCGAATACGTTAAAGGTATCAAAGGTAAACGTCAGA	234
	Seq_1	3541	ACTCTCTGAAAATCACCAGTATCGAATCTACTAAGCTTGATGGGGATCCCATGGTACG	3600
	Seq_2	233	ACTCTCTGAAAATCACCAGTATCGAATCTACTAAGCTTGATGGGGATCCCATGGTACG	174
	Seq_1	3601	CGTGCTAGAGGCATCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTT	3660
	Seq_2	173	CGTGCTAGAGGCATCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTT	114
	Seq_1	3661	TCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTC	3720
	Seq_2	113	TCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTC	54
	Seq_1	3721	GGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATATACTAGTAGCGGCCGCTGCA-----	3763
	Seq_2	53	GGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATATACTAGTAGCGGCCGCGAATCCAGAAATCA	1

Figura A10 -Alinhamento do sequenciamento da construção pSB1C3_SwDENV_Int9. (A) resultado *primer forward* (B) resultado *primer reverse*. São destacados, na ordem, em (A) parte da sequência do *BioBrick* prefixo (vinho), o promotor T7 (verde), o switch DENV10550(2) (azul), o linker (rosa) e o início do gene *int9* (azul-claro); em (B) destaca-se o final do gene *int9* (azul-claro), o terminador *rrnB* T1 (marrom), o terminador T7Te (laranja) e o *BioBrick* sufixo (vinho). Fonte: Próprio autor, imagens geradas no software *Serial Cloner*.