



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

MARIELE DE ARAÚJO PALMEIRAS

**DESENHO, CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM BIOSSENSOR *TOEHOLD*
SWITCH PARA DETECÇÃO DE INFLUENZA AVIÁRIA H5N1**

Brasília - DF

2026

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

MARIELE DE ARAÚJO PALMEIRAS

**DESENHO, CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM BIOSSENSOR *TOEHOLD*
SWITCH PARA DETECÇÃO DE INFLUENZA AVIÁRIA H5N1**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular pelo programa de pós-graduação em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Elíbio Leopoldo Rech Filho

Coorientadora: Dra. Grácia Maria Soares Rosinha

Brasília - DF

2026

AGRADECIMENTOS

À Dra. Grácia Rosinha, pelo convite generoso para atuar neste tema de pesquisa e pelo apoio atento em todas as etapas do projeto, assim como a parceria construída ao longo desta trajetória, que ultrapassou o âmbito acadêmico, deixando uma diferença profunda na minha formação científica e pessoal. A sua orientação foi essencial para a defesa desta dissertação, muito obrigada.

Ao Dr. Elibio Rech, pela orientação, disponibilização de recursos e investimentos, bem como pelo oferecimento de toda a estrutura necessária para a condução dos experimentos.

À Estefania Faria, pela presença constante no dia a dia do laboratório, acompanhando de perto cada etapa dos experimentos e os rumos do projeto. Pela companhia e pelas madrugadas divididas na conclusão de artigos científicos, cuja dedicação, parceria e amizade foram fundamentais para que este trabalho se concretizasse.

À Dra. Danielle Pedrolli, pelo apoio em diferentes etapas deste trabalho, desde a prospecção dos *switches* até a fase de otimização do protocolo experimental. Pelas discussões técnicas, sugestões e auxílio na condução dos ensaios, que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Dra. Rayane Lima, pelo apoio consultivo e pelas sugestões técnicas que auxiliaram na condução e no refinamento deste estudo.

Aos meus alunos de iniciação científica, Marcos e Letícia, pela paciência em me ouvir, pela proatividade em cada tarefa e pelo compromisso e apoio constantes ao longo do desenvolvimento deste trabalho, que tornaram o percurso mais leve e colaborativo.

Aos membros atuais e antigos do Prédio de Biologia Sintética (PBS) da Embrapa: Mariana, Nicole, Tomas, Marco, Lukas, Igor, Amanda, Gleiciane, Vinícius, Natan, Fábio, Stephan, Deborah e Helena, pelo auxílio nas rotinas de laboratório, pelas trocas de experiência e pelo convívio diário, que foram essenciais ao longo destes dois anos.

À Dra. Daniela Bittencourt e à Dra. Kenny Bonfim, pelo incentivo e pelas trocas de experiências valiosas ao longo do mestrado, em especial pelas discussões que contribuíram para aprimorar minha análise crítica dos experimentos.

À Dra. Patrícia Verdugo, pelas contribuições nas análises *in silico*, que agregaram valor ao trabalho, pela parceria estabelecida e por todo o apoio oferecido.

À Dra. Natália Lima, por ter plantado, ainda na época do estágio obrigatório, a semente da curiosidade científica. Cada experimento realizado naquele período, cada explicação e cada diálogo contribuíram de forma decisiva para minha formação e me trouxeram até aqui. Muito obrigada.

Às agências de fomento que viabilizaram financeiramente a realização deste trabalho, em especial CNPq, CAPES, FAP-DF e INCT-BioSyn. À UnB e Embrapa, pelo apoio e infraestrutura necessária ao desenvolvimento dos experimentos.

Ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), pela parceria e por ceder os RNAs de amostras de aves contaminadas, viabilizando as etapas subsequentes deste trabalho, por intermédio do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de São Paulo (LFDA-SP). Estendo meus agradecimentos aos membros do laboratório pela disponibilidade e pela receptividade.

Aos meus pais, Maria Sônia e Eduardo, pelo amor incondicional, pela educação que me deram e por acreditarem em mim em todos os momentos. Pelo apoio silencioso e constante e pela paciência com as ausências impostas pelo laboratório e pela escrita desta dissertação. Sem o exemplo, o cuidado e a confiança de vocês, este caminho não teria sido possível.

Ao Victor, pela escuta atenta dos impasses e triunfos de cada experimento nesses dois anos, sou profundamente grata pelo apoio e pela paciência.

À Maria Eduarda, minha âncora ao longo deste percurso, pelo incentivo constante, que me ajudou a seguir em frente com segurança. Sua participação foi essencial para que este trabalho se realizasse; dedico-lhe, com carinho, esta conquista.

A todos, muito obrigada, sem cada um de vocês não seria possível.

RESUMO

A Influenza Aviária, causada pelo vírus da família *Orthomyxoviridae*, é uma grave ameaça à saúde pública e à economia global. O vírus do tipo A, de maior importância epidemiológica, possui genoma segmentado em oito fitas de RNA simples em sentido negativo que codificam proteínas essenciais como a Hemaglutinina e a Neuraminidase. O subtipo H5N1, classificado como de alta patogenicidade, apresenta elevada capacidade de mutação e salto zoonótico, com o clado 2.3.4.4b consolidado como linhagem dominante, associado a altas taxas de mortalidade em aves e mamíferos. Diante da necessidade de métodos diagnósticos rápidos e descentralizados, este trabalho avaliou experimentalmente um biossensor baseado em *Toehold switches* integrado ao sistema de expressão gênica livres de células para detecção dos genes H5 e N1. O *design in silico* de seis sensores candidatos foi realizado no *software Nucleic Acid Package*, com base em regiões conservadas do vírus, seguido pela construção de um sistema de dois plasmídeos: um módulo de detecção (expressando serina integrase 13) e outro de resposta (contendo o gene da *luciferase*). Os ensaios foram conduzidos com o sistema T7 S30 *Extract System for Circular DNA*. A triagem inicial com RNA sintético permitiu selecionar os sensores H5-b e N1-f, que apresentaram melhor desempenho em curvas de dose-resposta. As condições ótimas foram definidas em 45,5 ng (1:3) de DNA para H5-b e 33 ng (2:1) para N1-f. Durante a prova de conceito, observaram-se desafios de reprodutibilidade e ruído de fundo, atribuídos à contaminação de reagentes e degradação por RNases. A adoção de procedimentos de manipulação controlados e o uso de inibidores de RNase permitiram que o sensor N1-f exibisse luminescência superior ao controle negativo. Análises termodinâmicas sugerem que a robustez do sensor N1-f pode estar associada à predominância de estruturas secundárias energeticamente favoráveis, o que pode influenciar a exposição relativa de regiões de fita simples e, consequentemente, a estabilidade do RNA no sistema livre de células. O presente trabalho enfatiza que a estratégia de *toehold switches* em plataformas *cell-free* é promissora para a vigilância do H5N1, embora dependa do controle de RNases e do *design* de sensores estruturalmente estáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Influenza Aviária; Interruptor genético; Expressão gênica livre de células; Biossensor.

ABSTRACT

Avian Influenza, caused by a virus of the family *Orthomyxoviridae*, represents a serious threat to public health and the global economy. Influenza A virus, of greatest epidemiological relevance, possesses a genome segmented into eight single-stranded, negative-sense RNA segments encoding essential proteins such as Hemagglutinin and Neuraminidase. The H5N1 subtype, classified as highly pathogenic, exhibits high mutation capacity and zoonotic spillover potential, with clade 2.3.4.4b established as the dominant lineage, associated with elevated mortality rates in birds and mammals. Given the need for rapid and decentralized diagnostic methods, this study experimentally evaluated a biosensor based on toehold switches integrated into a cell-free gene expression system for the detection of the H5 and N1 genes. The *in silico* design of six candidate sensors was performed using the Nucleic Acid Package software, based on conserved viral regions, followed by the construction of a two-plasmid system: a detection module (expressing serine integrase 13) and a response module (containing the *luciferase* gene). Assays were conducted using the T7 S30 Extract System for Circular DNA. Initial screening with synthetic RNA enabled the selection of sensors H5-b and N1-f, which demonstrated superior performance in dose-response curves. Optimal conditions were defined at 45.5 ng (1:3) of DNA for H5-b and 33 ng (2:1) for N1-f. During proof-of-concept experiments, reproducibility challenges and background noise were observed, attributed to reagent contamination and RNase-mediated degradation. The adoption of controlled handling procedures and the use of RNase inhibitors enabled the N1-f sensor to exhibit luminescence levels exceeding the negative control. Thermodynamic analyses suggest that the robustness of the N1-f sensor may be associated with the predominance of energetically favorable secondary structures, potentially influencing the relative exposure of single-stranded regions and, consequently, RNA stability within the cell-free system. This study highlights that the toehold switch strategy in cell-free platforms is promising for H5N1 surveillance, although it depends on stringent RNase control and the design of structurally stable sensors.

KEYWORDS: Avian Influenza; Genetic switch; Cell-free gene expression; Biosensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de replicação do Vírus da Influenza Aviária (VIA).....	19
Figura 2. Estrutura da partícula do VIA.....	21
Figura 3. Linha do tempo da evolução do vírus Influenza A em aves e suínos.....	22
Figura 4. Mecanismo de funcionamento do <i>toehold switch</i>	33
Figura 5. Esquema da integração sítio-específica mediada por integrase entre os sítios <i>attP</i> e <i>attB</i>	35
Figura 6a. <i>Hairpin</i> previsto para a primeira sequência do subtipo H5 (H5-a), gerada pelo <i>software</i> NUPACK.....	42
Figura 6b. <i>Hairpin</i> previsto para a segunda sequência do subtipo H5 (H5-b), gerada pelo <i>software</i> NUPACK.....	43
Figura 6c. <i>Hairpin</i> previsto para a terceira sequência do subtipo H5 (H5-c), gerada pelo <i>software</i> NUPACK.....	44
Figura 6d. <i>Hairpin</i> previsto para a primeira sequência do subtipo N1 (N1-d) gerada pelo <i>software</i> NUPACK.....	45
Figura 6e. <i>Hairpin</i> previsto para a segunda sequência do subtipo N1 (N1-e) gerada pelo <i>software</i> NUPACK.....	46
Figura 6f. <i>Hairpin</i> previsto para a terceira sequência do subtipo N1 (N1-f) gerada pelo <i>software</i> NUPACK.....	47
Figura 7. Plasmídeo correspondente ao módulo de detecção do sistema <i>toehold switch</i>	49
Figura 8. Plasmídeo correspondente ao módulo de resposta do sistema <i>toehold switch</i>	50
Figura 9. Validação dos plasmídeos e dos moldes de transcrição dos RNAs <i>trigger</i>	59
Figura 10. Triagem dos <i>switches</i> para detecção do gene H5.....	60

Figura 11. Triagem dos <i>switches</i> para detecção do gene N1.....	61
Figura 12. Refinamento da proporção entre os módulos de detecção e resposta para o <i>switch</i> H5-b.....	62
Figura 13. Refinamento da proporção entre os módulos de detecção e resposta para o <i>switch</i> N1-f.....	63
Figura 14. Curvas de resposta do <i>switch</i> H5-b.....	64
Figura 15. Curvas de resposta do <i>switch</i> N1-f.....	65
Figura 16. Variação do sinal de fundo (0 nM de RNA) dos <i>switches</i> H5-b e N1-f ao longo das réplicas biológicas.....	65
Figura 17. Avaliação pontual do <i>switch</i> N1-f em diferentes concentrações totais e proporções entre os módulos de detecção e resposta.....	67
Figura 18. Avaliação da luminescência do <i>switch</i> N1-f sob novo protocolo e condições previamente otimizadas de DNA.....	68
Figura 19. Tentativa de réplica do ensaio do <i>switch</i> N1-f sob as condições otimizadas de DNA.....	68
Figura 20. Ensaio pontual do <i>switch</i> N1-f com adição de inibidor de RNase.....	69
Figura 21. Comparação das estruturas secundárias previstas para os complexos H5-b e N1-f.	72
Figura 22. Evolução do <i>Fold Change</i> dos sensores H5-b e N1-f ao longo das réplicas R1-R3 sob degradação por RNases.....	73
Figura 23. Fluxo de trabalho para detecção de RNA viral via biossensores <i>toehold switch</i>	74
Figura A1. Alinhamento múltiplo de sequências do gene HA (H5).....	84
Figura A2. Alinhamento múltiplo de sequências do gene NA (N1).....	85
Figura A3. Mapa esquemático do primeiro plasmídeo construído para o subtipo H5 (<i>switch</i> H5-a).....	86

Figura A4. Mapa esquemático do segundo plasmídeo construído para o subtipo H5 (<i>switch</i> H5-b).....	88
Figura A5. Mapa esquemático do terceiro plasmídeo construído para o subtipo H5 (<i>switch</i> H5-c).....	90
Figura A6. Mapa esquemático do primeiro plasmídeo construído para o subtipo N1 (<i>switch</i> N1-d).....	92
Figura A7. Mapa esquemático do segundo plasmídeo construído para o subtipo N1 (<i>switch</i> N1-e).....	95
Figura A8. Mapa esquemático do terceiro plasmídeo construído para o subtipo N1 (<i>switch</i> N1-f).....	97
Figura A9. Mapa esquemático do plasmídeo construído para a leitura da luciferase.....	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequências de nucleotídeos correspondentes aos alvos dos genes H5 e N1 do vírus Influenza A (H5N1).....	40
Quadro 2a. Primeira sequência do subtipo H5 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura <i>hairpin</i> apresentada anteriormente.....	42
Quadro 2b. Segunda sequência do subtipo H5 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura <i>hairpin</i> apresentada anteriormente.....	43
Quadro 2c. Terceira sequência do subtipo H5 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura <i>hairpin</i> apresentada anteriormente.....	44
Quadro 2d. Primeira sequência do subtipo N1 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura <i>hairpin</i> apresentada anteriormente.....	45
Quadro 2e. Segunda sequência do subtipo N1 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura <i>hairpin</i> apresentada anteriormente.....	46

Quadro 2f. Terceira sequência do subtipo N1 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura <i>hairpin</i> apresentada anteriormente.....	47
Quadro 3. Sequências dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> utilizados para anelamento das regiões alvo dos genes H5 e N1 do vírus Influenza A (H5N1).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições experimentais da triagem inicial dos <i>switches</i> H5 e N1.....	52
Tabela 2. Condições testadas no refinamento dos <i>switches</i> H5-b e N1-f selecionados após triagem inicial.....	53
Tabela 3. Condições finais definidas para os <i>switches</i> selecionados após os ensaios de triagem e refinamento.....	54
Tabela 4. Condições experimentais dos ensaios de prova de conceito dos <i>switches</i> H5-b e N1-f.....	54
Tabela 5. Avaliação do efeito da concentração total de DNA plasmidial e da proporção entre módulos de detecção e resposta sob novo protocolo.....	55
Tabela 6. Condições experimentais dos ensaios com o <i>switch</i> N1-f após padronização do protocolo.....	56
Tabela 7. Condições experimentais do ensaio adicional com o <i>switch</i> N1-f incluindo a adição de inibidor de RNase.....	56
Tabela 8. Avaliação das propriedades termodinâmicas dos biossensores baseados em <i>toehold switch</i>	71
Tabela B1. Dados brutos de luminescência da triagem dos <i>switches</i> H5-a, H5-b e H5-c em função da concentração de RNA sintético (Figura 10).....	103
Tabela B2. Dados brutos de luminescência da triagem dos <i>switches</i> N1-d, N1-e e N1-f em função da concentração de RNA sintético (Figura 11).....	103

Tabela B3. Dados brutos de luminescência do ensaio de refinamento das condições de DNA para o <i>switch</i> H5-b em função da concentração de RNA sintético (Figura 12).....	104
Tabela B4. Dados brutos de luminescência do ensaio de refinamento das condições de DNA para o <i>switch</i> N1-f em função da concentração de RNA sintético (Figura 13).....	104
Tabela B5. Dados brutos de luminescência do ensaio de prova de conceito do <i>switch</i> H5-b em diferentes concentrações de RNA sintético (Figura 14).....	105
Tabela B6. Dados brutos de luminescência do ensaio de prova de conceito do <i>switch</i> N1-f em diferentes concentrações de RNA sintético (Figura 15).....	106
Tabela B7. Valores de luminescência do controle negativo (0 nM de RNA) para os <i>switches</i> H5-b e N1-f nas três réplicas biológicas (Figura 16).....	107
Tabela B8. Dados brutos de luminescência do ensaio pontual de avaliação do novo protocolo para o <i>switch</i> N1-f em 0 e 20 nM de RNA sintético (Figura 17).....	108
Tabela B9. Dados brutos de luminescência do ensaio pontual nas condições otimizadas de DNA para o <i>switch</i> N1-f em 0 e 20 nM de RNA sintético (Figura 18).....	108
Tabela B10. Dados brutos de luminescência da tentativa de réplica nas condições otimizadas de DNA para o <i>switch</i> N1-f em 0 e 20 nM de RNA sintético (Figura 19).....	109
Tabela B11. Dados brutos de luminescência do ensaio do <i>switch</i> N1-f com adição de inibidor de RNase, nas condições de 0 e 20 nM de RNA sintético (Figura 20).....	109
Tabela B12. Dados de <i>Fold Change</i> dos sensores H5-b e N1-f nas réplicas R1-R3 com 200 nM de RNA sintético alvo (Figura 22).....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLADE - *Boolean Logic and Arithmetic through DNA Excision* (lógica booleana e aritmética através da excisão de dna)

BSA - *Bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (centros de controle e prevenção de doenças)

CDS - *Coding DNA Sequence* (região codificadora)

CFPS - Cell-Free Protein Synthesis (síntese de proteínas livre de células)

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DNase - Desoxirribonuclease

dsDNA - *Double-Stranded DNA* (DNA dupla fita)

dtRNA - *Degradation tuning RNA* (ajuste da degradação do RNA)

EGFP - *Enhanced Green Fluorescent Protein* (proteína verde fluorescente aprimorada)

EMA - Europeu-Oriente Médio-Africano

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura)

FAPDF - Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GFP - *Green Fluorescent Protein* (proteína fluorescente verde)

HA - Hemaglutinina

IA - Influenza Aviária

IAAP - Influenza Aviária de Alta Patogenicidade

IABP - Influenza Aviária de Baixa Patogenicidade

INCT - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia

LB - Luria-Bertani

LUC - Luciferase

MAFFT - *Multiple Alignment using Fast Fourier Transform* (alinhamento múltiplo usando a transformada rápida de fourier)

MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária

mRNA - RNA mensageiro

MFE - *Minimum Free Energy* (energia livre mínima)

M - Proteína de matriz

M1 - Proteína de matriz 1

M2 - Proteína de matriz 2

NA - Neuraminidase

NASBA - *Nucleic Acid Sequenced Based Amplification* (amplificação baseada em sequenciamento de ácido nucleico)

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (centro nacional de informação sobre biotecnologia)

NEB - *New England Biolabs*

NEP - *Nuclear Export Protein* (proteína de exportação nuclear)

NP - Nucleoproteína

NS1 - Nonstructural Protein 1

NS2 - Nonstructural Protein 2

NUPACK - *Software The Nucleic Acid Package* (pacote de ácidos nucleicos)

OMSA - Organização Mundial de Saúde Animal

PA - *Polymerase Acidic Protein* (proteína ácida da polimerase)

PB - Pares de bases

PBS - Prédio de Biologia Sintética

PB1 - *Polymerase Basic Protein 1* (proteína básica da polimerase 1)

PB2 - *Polymerase Basic Protein 2* (proteína básica da polimerase 2)

RB - Réplicas Biológicas

RBS - *Ribosome Binding Site* (sítio de ligação do ribossomo)

RdRp - *RNA-dependent RNA polymerase* (RNA polimerase dependente de RNA)

RLU - *Relative Light Units* (unidades relativas de luz)

RNA - *Ribonucleic Acid* (ácido ribonucleico)

RNase - Ribonuclease

RNP - *Ribonucleoprotein* (ribonucleoproteína)

RT-qPCR - *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*
(transcrição reversa quantitativa em reação em cadeia da polimerase)

SARS-CoV - *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave)

sfgfp - *superfolder green fluorescent protein*

TBE - Tris-Borato-EDTA

VIA - Vírus da Influenza Aviária

°C - Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Influenza Aviária.....	18
1.2 Vírus da IA.....	20
1.2.1 Evolução do VIA.....	22
1.2.2 Distribuição epidemiológica atual da IA em nível global.....	25
1.2.3 VIA em mamíferos.....	27
1.3 Métodos de diagnóstico e subtipagem do VIA.....	29
1.4 Biossensores como método diagnóstico.....	31
1.4.1 <i>Toehold switches</i>	32
1.4.2 Serina integrases sítio-específicas.....	34
1.4.3 Plataformas de expressão gênica em sistemas livre de células (<i>cell-free systems</i>).....	36
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Escolha das sequências de RNA alvo e <i>design</i> dos <i>toehold switches</i>	39
3.2 Síntese dos RNAs <i>trigger</i> e construção dos plasmídeos.....	47
3.3 Clonagem dos plasmídeos em <i>E. coli</i> DH5α.....	50
3.4 Reações livres de células e leitura da luminescência.....	51
3.5 Condições experimentais dos ensaios de triagem, refinamento e prova de conceito.....	52
3.6 Ensaios com o <i>switch</i> N1-f após padronização do protocolo e uso de inibidor de RNase.....	55
3.7 Predição estrutural e análise termodinâmica <i>in silico</i>	56
3.8 Análise estatística.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 Seleção dos alvos e desenho dos sensores.....	57

4.2 Validação dos plasmídeos e síntese dos RNAs.....	58
4.3 Triagem dos sensores em reação livre de células.....	59
4.4 Refinamento das condições de DNA (H5-b e N1-f).....	61
4.5 Prova de conceito e problemas de reprodutibilidade.....	64
4.6 Efeito de RNase e recuperação do sinal com inibidor.....	68
4.7 Investigação <i>in silico</i> dos sensores.....	70
4.8 Validação experimental e correlação <i>in silico/in vitro</i>	72
5. CONCLUSÃO.....	75
6. LIMITAÇÕES, PERSPECTIVAS FUTURAS E CONTRIBUIÇÃO DO TRABALHO	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
8. APÊNDICES.....	84
9. ANEXOS - <i>SCRIPT</i> NUPACK (Franco <i>et al.</i> , 2023).....	110

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário global da avicultura, ocupando a terceira posição entre os maiores produtores mundiais e liderando as exportações de carne de frango. Em 2024, a produção nacional alcançou cerca de 15 milhões de toneladas, o maior patamar dos últimos dez anos, enquanto as exportações totalizaram aproximadamente 5,29 milhões de toneladas, com receita estimada em US\$ 9,9 bilhões. No mesmo período, a produção de ovos apresentou crescimento contínuo, alcançando cerca de 57 bilhões de unidades, majoritariamente destinadas ao consumo interno. Ainda assim, as exportações somaram aproximadamente 18,5 mil toneladas, gerando receita de US\$ 39,3 milhões, com destinos a 81 países, concentrados principalmente na Ásia, no Oriente Médio e na América Latina. Esse cenário reforça o papel estratégico do Brasil no abastecimento global de proteína animal e evidencia sua inserção em mercados internacionais sensíveis a questões sanitárias relacionadas à Influenza Aviária (IA) (ABPA, 2025).

Considerando a expressiva importância econômica da avicultura e as exigências sanitárias rigorosas impostas ao comércio internacional de produtos avícolas, a manutenção da saúde das aves constitui elemento essencial para a sustentabilidade e competitividade do setor. Entre as doenças de notificação obrigatória, a IA destaca-se como uma das principais ameaças globais, pois sua detecção pode desencadear restrições comerciais imediatas, além de comprometer a segurança alimentar e gerar impactos econômicos significativos nas regiões afetadas. A ampla circulação do vírus Influenza A em aves domésticas e silvestres, associada às rotas migratórias, favorece a introdução e a dispersão do agente em diferentes territórios. Nesse contexto, estratégias eficazes de vigilância epidemiológica e diagnóstico precoce tornam-se fundamentais para mitigar riscos sanitários e preservar a estabilidade econômica da cadeia produtiva avícola (MacLachlan; Boussios; Hagerman, 2021; WOA, 2024).

O desenvolvimento e a avaliação de novas estratégias diagnósticas para a detecção de IA são essenciais para o fortalecimento das ações de vigilância conduzidas pelo MAPA e organizações internacionais. Métodos mais sensíveis e ágeis permitem a detecção precoce de focos da doença e a adoção de medidas de contenção, contribuindo para a mitigação de riscos à saúde pública e para a redução

de prejuízos econômicos decorrentes de restrições sanitárias. Nesse sentido, pesquisas voltadas à inovação diagnóstica contribuem diretamente para a manutenção do *status* sanitário livre de IA e para a proteção da avicultura sob a perspectiva da saúde única (Brasil, 2024b; WOA, 2024; Swayne *et al.*, 2024).

1.1 Influenza Aviária

A IA é uma doença que acomete predominantemente aves domésticas e silvestres, sendo causada pelo vírus pertencente à família *Orthomyxoviridae*, o qual pode se apresentar sob a forma de Influenza Aviária de Baixa Patogenicidade (IABP) ou Influenza Aviária de Alta Patogenicidade (IAAP) (WOAH, 2023). A doença pode ser classificada segundo diferentes critérios. Quanto ao tipo viral, são reconhecidos quatro grupos distintos: A, B, C e D. Dentre esses, o tipo A é o mais relevante do ponto de vista epidemiológico e o mais amplamente estudado, diferenciando-se dos demais pela similaridade das proteínas internas, especificamente a nucleoproteína (NP) e a proteína de matriz (M), cujas especificidades imunológicas permitem a classificação dos vírus nesses quatro tipos (Palese, 1977; CDC, 2024a).

Uma segunda classificação baseia-se em duas glicoproteínas de superfície, a Hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), que desempenham papéis fundamentais nos mecanismos de ação da doença, ilustrados na Figura 1, nas etapas 1a e 9. Atualmente, são reconhecidos 29 subtipos virais, distribuídos entre 18 subtipos de HA e 11 subtipos de NA, os quais podem originar até 198 combinações distintas por meio de rearranjos genéticos (Tong *et al.*, 2013; Swayne, 2023; CDC, 2024a).

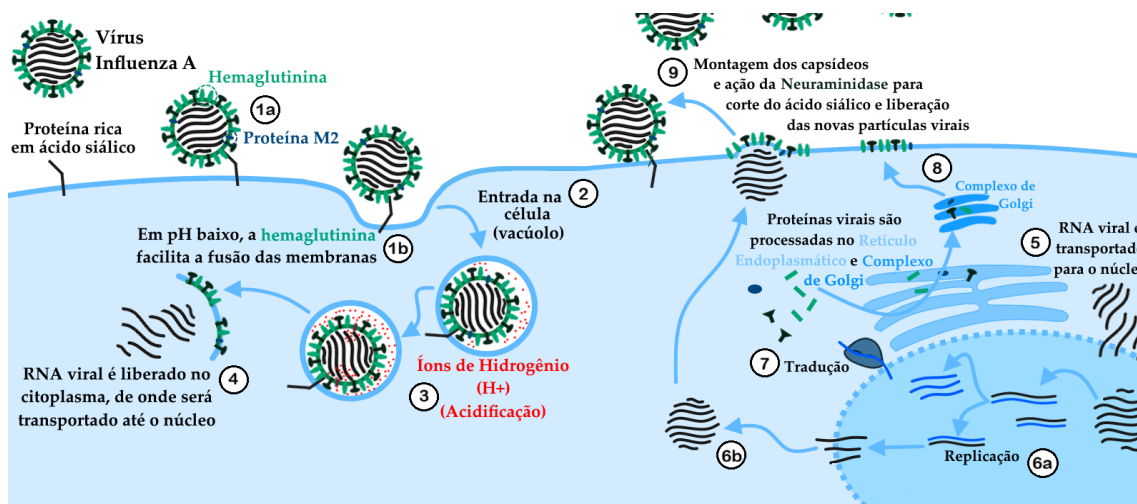


Figura 1. Ciclo de replicação do vírus da Influenza Aviária (VIA). Representação esquemática das principais etapas do ciclo replicativo do vírus influenza A em célula hospedeira, incluindo a ligação da hemaglutinina aos receptores contendo ácido siálico, internalização por endocitose, acidificação endossomal mediada por íons H^+ e proteína M2, fusão de membranas e liberação do RNA viral. O RNA é então transportado ao núcleo para replicação e transcrição, seguido pela tradução das proteínas virais no citoplasma e seu processamento no retículo endoplasmático e complexo de Golgi. A montagem dos novos vírions ocorre na membrana plasmática, culminando na liberação por brotamento, com participação da neuraminidase. Fonte: Adaptada de Fiocruz (2025).

O primeiro registro de IA data de 1878, descrevendo-a como uma doença respiratória de alta mortalidade em aves (Perroncito, 1978). Apesar de ter sido erroneamente identificada como cólera aviária, esse estudo inicial foi crucial para o avanço do conhecimento sobre o vírus (Prinzi; Rohde, 2022). O subtipo H1N1, identificado anos depois, causou em 1918 a maior pandemia de origem aviária já registrada, a Gripe Espanhola, que foi responsável por aproximadamente 50 milhões de óbitos globalmente, segundo dados de Johnson e Mueller (2002).

A propagação do vírus entre as aves ocorre tanto de forma direta, pelo contato com secreções respiratórias, quanto indireta, por meio de água, alimentos e utensílios contaminados (PAHO, 2023). Esse ciclo de transmissão é sustentado pelas aves aquáticas, que atuam como reservatórios ao portarem o vírus de maneira assintomática durante o ano inteiro. No entanto, a manifestação da doença varia drasticamente entre as espécies: enquanto em aves silvestres a infecção raramente é aparente, em aves domésticas ela se torna evidente, progredindo de tosse e espirros para quadros respiratórios graves e uma queda acentuada na produção de ovos (Bucko; Gieger, 2019). Os sinais clínicos ainda variam de acordo com o nível de patogenicidade da doença, animais infectados com o vírus IAAP possuem uma

alta taxa de mortalidade além de problemas respiratórios e neurológicos severos (Brasil, 2020).

1.2 Vírus da IA

A partícula do VIA possui entre 100 e 300 nm de comprimento e cerca de 13,5 Kb de tamanho, apresentando um genoma dividido em oito segmentos de RNA de fita simples de sentido negativo. Essa configuração implica que o genoma é incapaz de realizar a tradução instantaneamente ao infectar uma célula, pois o material genético é apenas complementar ao mRNA, o que exige sua conversão para uma fita de sentido positivo que possa ser lida pelos ribossomos da célula hospedeira (Cheung; Poon, 2007; Bouvier; Palese, 2008). Para essa finalidade, três dos oito segmentos virais codificam a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). As subunidades PB2, PB1 e PA compõem esse complexo enzimático, permitindo a produção do mRNA necessário para codificar as proteínas virais; nesse processo, o complexo é responsável tanto pela transcrição quanto replicação do genoma viral (Detjen *et al.*, 1987; Akkina *et al.*, 1987; Honda; Mizumoto; Ishihama, 2002).

O segmento 4 codifica a glicoproteína de superfície HA, considerada uma das proteínas mais essenciais do vírus. Sua capacidade antigênica desempenha a função de reconhecimento e ligação aos receptores de ácido siálico das células que serão infectadas, além de fundir o envelope viral com a membrana plasmática para a internalização do vírus por endocitose (Hirst, 1942; Choppin; Compans, 1975). O quinto segmento, por sua vez, codifica a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo, NP, que tem a função de organizar e proteger todos os oito segmentos do ambiente externo. Sua interação com as proteínas PA, PB1 e PB2 é conhecida como o complexo ribonucleoproteína (RNP) (Lamb, 1989). Já o sexto segmento do genoma do vírus codifica a segunda glicoproteína de superfície, NA. A proteína é capaz de clivar o ácido siálico presente na superfície da mucina no trato respiratório, a fim de facilitar a adesão e a passagem do vírus pela barreira de proteção das células-alvo (Burnet; Mccrea; Anderson, 1947; Gottschalk, 1957; Schulman; Palese, 1977).

As proteínas de matriz 1 e 2 (M1 e M2) são codificadas pelo sétimo segmento do RNA viral por meio de *splicing* alternativo (Samji, 2009). A proteína M1 participa da estabilidade e montagem dos novos vírions, enquanto a M2 promove a estrutura de um canal iônico responsável por acidificar o ambiente celular, alterando a conformação da proteína HA para permitir a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo e a dissociação da M1 das ribonucleoproteínas (Lamb, 1989; Pinto; Holsinger; Lamb, 1992). Por fim, o oitavo segmento codifica duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2, também conhecida como proteína de exportação nuclear - NEP) também por *splicing* alternativo (Samji, 2009). A NS1 contribui para a evasão do sistema imunológico, enquanto a NS2 auxilia a exportação e montagem dos componentes virais (Lamb, 1989; Nemeroff *et al.*, 1998; García-Sastre *et al.*, 1998; O'Neill; Talon; Palese, 1998). Todos os segmentos estão representados na Figura 2.

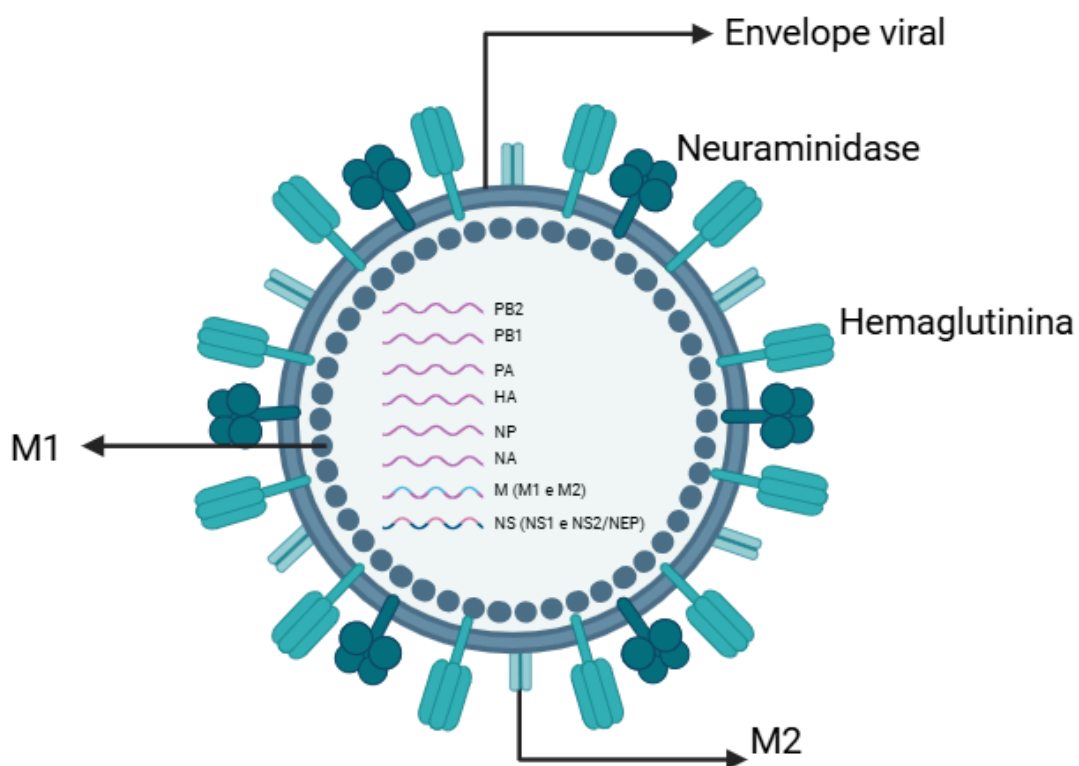


Figura 2. Estrutura da partícula do VIA. Representação esquemática evidenciando o envelope viral, as glicoproteínas de superfície HA e NA, as proteínas de matriz M1 e M2, e os oito segmentos de RNA de fita simples de polaridade negativa associados ao complexo RNP. Fonte: Produzida em BioRender.

1.2.1 Evolução do VIA

Cerca de quarenta anos após o primeiro registro da IA em 1878, surgiu o primeiro histórico de contágio pelo subtipo H5N1 de alta patogenicidade, que provocou epizootias e levou ao abate em massa de diversas aves como medida de controle (Pereira; Tumová; Law, 1965). A elevada capacidade de mutação do VIA favoreceu, posteriormente, o primeiro salto zoonótico, ocorrido em 1997 (Figura 3), quando infecções humanas resultaram em cinco óbitos (Claas *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2025).

Esse comportamento adaptativo está diretamente relacionado à dinâmica evolutiva do vírus influenza A, cuja variabilidade genética decorre principalmente de dois processos distintos. O primeiro, denominado deriva antigênica (*antigenic drift*), resulta do acúmulo progressivo de mutações pontuais nos segmentos genéticos que codificam as glicoproteínas de superfície HA e NA, promovendo alterações graduais na antigenicidade viral. O segundo mecanismo, conhecido como salto antigênico (*antigenic shift*), envolve o rearranjo de segmentos genômicos entre diferentes cepas que coinfectam um mesmo hospedeiro, podendo originar vírus com novas combinações antigênicas e potencial pandêmico, frequentemente associados a eventos de transmissão interespecífica (Taubenberger; Kash, 2010).

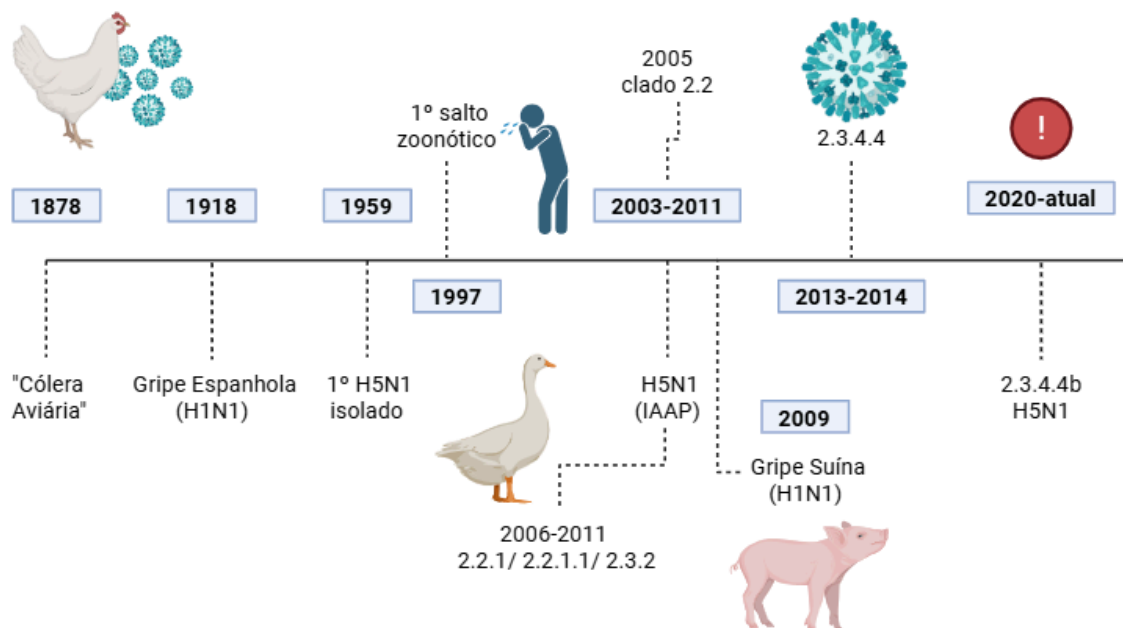


Figura 3. Linha do tempo da evolução do vírus Influenza A em aves e suínos. Representação esquemática dos principais marcos históricos associados aos subtipos H1N1 e H5N1, incluindo o primeiro isolamento viral, eventos de salto zoonótico, emergência de clados relevantes, surtos de

IAAP e a circulação recente do clado 2.3.4.4b. Fonte: Adaptada de Xie *et al.* (2025). Produzida em BioRender.

A ocorrência desses mecanismos ao longo das últimas décadas tem contribuído para a emergência recorrente de surtos e epidemias, como observado no início dos anos 2000. Entre dezembro de 2003 e março de 2004, a Coreia do Sul registrou sua primeira epidemia de IAAP causada pelo subtipo H5N1, o que resultou no abate de aproximadamente 5 milhões de galinhas e patos. No mesmo período, outros sete países da Ásia também foram afetados por surtos de IA (Lee *et al.*, 2005). Entre eles, a Tailândia vivenciou igualmente sua primeira epidemia por H5N1 IAAP, com a morte ou sacrifício de cerca de 62 milhões de aves (Tiensin *et al.*, 2005). Além disso, foram documentados casos de infecção humana, dos quais oito óbitos ocorreram entre 33 indivíduos acometidos, em decorrência de pneumonia grave associada à infecção viral (Chotpitayasunondh *et al.*, 2005).

Em 2005, o lago Qinghai, localizado em uma importante reserva natural de aves migratórias na China tornou-se um dos principais focos de disseminação do vírus. Entre 4 de maio e 29 de junho, aproximadamente 6.184 aves, incluindo gaivotas, gansos, grandes corvos-marinheiros e patos-ferrugem, foram encontradas mortas em decorrência do surto. A infecção pelo subtipo H5N1 foi confirmada por meio de análises histopatológicas utilizando anticorpos policlonais anti-H5, além do isolamento viral. Posteriormente, foi sequenciado o genoma completo de 15 isolados. A comparação do gene PB2 com sequências previamente analisadas revelou menos de 97% de similaridade, sugerindo a formação de três clados distintos. Adicionalmente, foi identificada em alguns isolados uma mutação no gene PB2, caracterizada pela substituição do aminoácido lisina na posição 627, alteração associada à elevada virulência em camundongos e à adaptação em hospedeiros humanos (Chen *et al.*, 2006).

A detecção do subtipo H5N1 IAAP no Leste Europeu, Oriente Médio e Norte da África ocorreu pela primeira vez após o surto de 2005 na Ásia, sendo provável que a disseminação tenha ocorrido por meio de aves migratórias (Salzberg *et al.*, 2007). A análise filogenética do gene HA, conduzida por Salzberg *et al.* (2007), evidenciou a presença de três grandes clados, designados V1, V2 e Europeu-Oriente Médio-Africano (EMA), este último subdividido em três subclados

em virtude de evolução independente. Diante da ausência de padronização na nomenclatura das linhagens do VIA, foi proposto um sistema unificado de classificação para o subtipo H5 IAAP. Esse sistema organiza os vírus em clados hierárquicos decimais, substituindo a denominação geográfica anteriormente utilizada. Por exemplo, a linhagem conhecida como “linhagem de Qinghai”, relacionada ao surto de 2005 no lago Qinghai, passou a ser identificada como clado 2.2. Essa classificação foi utilizada em estudos como o de Cattoli *et al.* (2009), com o objetivo de padronizar as análises filogenéticas e favorecer comparações consistentes entre diferentes isolados (Evolution Working Group *et al.*, 2008; WHO *et al.*, 2011).

De acordo com dados de Arafa *et al.* (2012), os clados de terceira e quarta ordem, 2.2.1 e 2.2.1.1, circularam pelo Egito entre 2006 e 2011. Além disso, El-Shesheny *et al.* (2014) ao caracterizarem molecularmente o VIA na mesma região entre 2006 e 2013 identificaram um novo agrupamento (*cluster*) em sua análise filogenética. Esse *cluster*, presente em cepas de 2010 a 2013, apresentou divergência superior a 1,5% em comparação com os clados já registrados, o que indicou a necessidade de expandir a classificação dos subclados existentes na época. De forma semelhante, a análise filogenética de cepas da Coreia do Sul, encontradas entre 2010 e 2011, identificou a circulação do clado 2.3.2. Os estudos de Kim *et al.* (2012) demonstraram que as sequências analisadas continham mais de 99% de congruência com as cepas circulantes em países da Ásia Oriental e Europa.

Ao longo dos anos, com os constantes rearranjos genéticos, o vírus sofreu diversas mutações que resultaram no surgimento de novos clados e subtipos; os estudos de sequenciamento genético os classificam com base em sua similaridade. Um exemplo desse processo é a possível origem do surto de H5N2 IAAP na China. A hipótese sugere que, devido à sua alta semelhança genética, o subtipo H5N2 possa ter surgido de diferentes clados de H5N1. Mutações nos genes NA e NS1 de vários subtipos, inclusive o H9N2, podem ter gerado a porção NA desse novo vírus (Zhao *et al.*, 2012).

Essa dinâmica da evolução viral é visível na rápida disseminação do clado H5 IAAP 2.3.4.4 a partir de 2014, que se espalhou globalmente por meio de aves de migração intercontinental. Análises filogenéticas do gene da HA identificaram longos

ramos, o que resultou na subdivisão do clado em quatro grupos distintos (A-D). O grupo A (2.3.4.4a) consiste em isolados do vírus H5N8, caracterizados como intercontinentais por terem sido encontrados na Ásia, América do Norte e Europa. Também foram identificados os subtipos H5N2 e H5N3 em Taiwan, H5N1 e H5N2 na América do Norte. O grupo B (2.3.4.4b) compreende os vírus H5N8 e H5N1 da China e Coreia (2013-2014). O grupo C (2.3.4.4c) inclui os vírus H5N6 da China e Laos (2013-2014), com o vírus H5N1 também sendo identificado no Vietnã e na China nesse período. Por fim, o grupo D (2.3.4.4d) abrange os vírus H5N6 da China e Vietnã, incluindo isolados de origem humana. É importante destacar que a fonte primária dos vírus H5 resultantes desses rearranjos genéticos foi o vírus H5N1 do clado 2.3.4 (Lee *et al.*, 2016; European Food Safety Authority *et al.*, 2021).

Os primeiros relatos da detecção do clado 2.3.4.4b na Europa ocorreram nos primeiros meses de 2020, com identificações subsequentes no Iraque, Rússia, Alemanha e outros países. Com a realização da análise das amostras foi identificado que o sítio de clivagem da HA possuía natureza polibásica. Essa característica facilita o reconhecimento da proteína viral por receptores de diversos tecidos das células hospedeiras, potencializando a entrada e a replicação do vírus (Lewis *et al.*, 2021). Segundo a Organização das Nações Unidas, desde 2021 mais de 300 milhões de aves em todo o mundo morreram em decorrência do vírus H5N1 IAAP 2.3.4.4b (ONU, 2024). Esse cenário reforça a importância do desenvolvimento de estudos, metodologias de detecção e medidas de prevenção voltadas à contenção da disseminação viral, especialmente do clado 2.3.4.4b, que atualmente se destaca como a linhagem dominante em circulação global e tem imposto desafios significativos no contexto de infecções em aves, mamíferos e humanos (Xie *et al.*, 2025).

1.2.2 Distribuição epidemiológica atual da IA em nível global

A Organização Pan-Americana da Saúde monitora a ocorrência de casos de IAAP associados ao subtipo H5N1 desde 2022, alguns dos quais evoluíram para cenários classificados como epidêmicos. Diante desse contexto, medidas sanitárias rigorosas, como o abate em larga escala de aves, têm sido recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) e pela Organização das Nações

Unidas para a Alimentação e a Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO) como estratégia de contenção da disseminação viral (PAHO, 2023). A adoção dessas medidas teve repercussões diretas em países afetados, como o Chile, que em março de 2023 registrou o abate de aproximadamente 40 mil aves em decorrência de surtos confirmados (FIOCRUZ, 2023). De acordo com o Serviço Agrícola e Pecuário Chileno, cerca de 50% do bando foi impactado, resultando em prejuízos econômicos significativos, incluindo perdas de empregos e redução do turismo em regiões afetadas (SAG, 2023).

Como desdobramento desse cenário nas Américas, impactos significativos sobre a vida selvagem e a biodiversidade em escala continental passaram a ser registrados, com relatos de disseminação viral em aves aquáticas e outros animais na Geórgia do Sul, Antártida (SCAR, 2024). Análises filogenéticas subsequentes, conduzidas por Banyard *et al.* (2024), indicaram que a introdução do vírus H5N1 do clado 2.3.4.4b ocorreu a partir da América do Sul, provavelmente mediada por aves migratórias. Esses achados reforçam a preocupação global quanto à expansão da IAAP entre aves e mamíferos, com exceção da Oceania, que permanece livre da circulação do vírus (WOAH, 2025).

No âmbito nacional, foram confirmados oito focos de IAAP em aves, dos quais apenas um ocorreu em sistema de produção comercial, notificado em maio de 2025 no estado do Rio Grande do Sul. Os demais focos foram identificados nos estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e no Distrito Federal. Ainda assim, o Brasil restabeleceu o *status* de país livre do vírus da gripe aviária em junho de 2025, conforme informações oficiais (Brasil, 2025c; Brasil, 2025b).

Mais recentemente, dados divulgados pela OMSA referentes a novembro de 2025, descrevem os surtos ocorridos ao longo do mês, com o registro de aproximadamente 267 aves domésticas e 660 aves não domésticas e mamíferos afetados. O documento também informa que cerca de 4.728.159 aves foram abatidas ou morreram em decorrência da infecção por IAAP, sendo a primeira ocorrência notificada na região do Porto, em Portugal. No período analisado, a Europa concentrou o maior número de notificações de novos surtos em populações aviárias, totalizando 217 registros, seguida pelas Américas, com 45 ocorrências, e pela Ásia, com 5 casos reportados (WOAH, 2025).

Devido aos indicadores alarmantes observados no continente europeu, a FAO emitiu um alerta de risco referente à possível reintrodução do clado 2.3.4.4b na África, com projeções para o final de 2025 e o início de 2026. O documento aponta evidências retrospectivas de circulação viral e indica elevada probabilidade de novos eventos, associada ao fluxo migratório de aves em direção ao sul durante o período de inverno. A organização também destaca que esse cenário pode ser agravado pela circulação concomitante do subtipo H9N2, aumentando o risco de *antigenic shift* decorrente de coinfeções. Nesse contexto, a FAO ressalta a necessidade de mobilização de equipes capacitadas e recomenda a intensificação das ações de vigilância, com ênfase na detecção precoce e na resposta rápida a eventuais surtos (FAO, 2025).

Dessa maneira, as aves migratórias exercem papel central na dinâmica de propagação da IA, atuando como reservatórios naturais de diversos patógenos. A interação entre aves silvestres e domésticas aumenta a suscetibilidade das granjas à IAAP e favorece os processos evolutivos do vírus. Esse cenário evidencia a necessidade de vigilância contínua, uma vez que o aumento de casos em mamíferos domésticos e selvagens constitui um importante sinal de alerta para o risco de adaptação viral à espécie humana (WOAH, 2025; Olowu *et al.*, 2026).

1.2.3 VIA em mamíferos

Diante do aumento de casos detectados em diferentes espécies, James *et al.* (2023) investigaram as potenciais rotas de transmissão do clado 2.3.4.4b em instalações avícolas localizadas na Grã-Bretanha, que incluíam patos de engorda, perus e frangos de corte, as três espécies de maior relevância comercial. Os autores observaram que o RNA viral infeccioso apresenta disseminação limitada a aproximadamente 10 m, enquanto partículas contendo RNA viral podem ser transportadas por distâncias de até 50 m. Apesar desse alcance relativamente baixo, o principal risco identificado refere-se à exposição humana, especialmente de indivíduos que manipulam aves contaminadas e podem permanecer assintomáticos, configurando um potencial fator de risco para a disseminação do vírus.

Desse modo, a circulação da IAAP H5N1 representa uma ameaça não apenas às aves comerciais e de subsistência, mas também a diversas espécies de

mamíferos, que passaram a ser infectadas em decorrência de mutações adaptativas do vírus, como evidenciado em casos de infecção em gado leiteiro e gatos domésticos registrados em diferentes locais dos Estados Unidos. Análises das amostras identificaram elevadas cargas de RNA viral nas glândulas mamárias, em consonância com os resultados obtidos em amostras de leite. As conclusões do estudo demonstram um alto tropismo viral pelo tecido mamário de bovinos, assim como pelo tecido do sistema nervoso central de felinos. Adicionalmente, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*) confirmou a exposição de trabalhadores das propriedades afetadas, os quais relataram sintomas do trato respiratório superior, febre e inflamação da conjuntiva (Caserta *et al.*, 2024; CDC, 2024b).

Frente à dinâmica evolutiva do vírus, Ulloa *et al.* (2023) identificaram uma associação significativa entre o clado 2.3.4.4b e eventos de mortalidade em massa entre pinípedes. As análises longitudinais de encalhes de leões-marinhos na África do Sul revelaram correlação estatística entre a mortalidade generalizada desses animais e a ocorrência de IAAP em aves silvestres. A maioria dos indivíduos infectados apresentou quadro agudo, caracterizado por rápida invasão do sistema nervoso central, sinais neurológicos graves e morte em curto intervalo de tempo.

De forma complementar, Araujo *et al.* (2024) relataram a ocorrência de substituições de aminoácidos nos genes virais, incluindo Q591K e D701N no gene PB2, R57Q no gene PA e V226T no gene NS, associadas à adaptação do vírus a mamíferos. A infecção relacionada a essas variantes foi inicialmente detectada na América do Norte e, posteriormente, identificada em leões-marinhos no Brasil e em outros países da América do Sul, evidenciando a expansão geográfica do vírus. Em decorrência disso, o aumento da detecção de IAAP em mamíferos e a identificação de marcadores moleculares de adaptação levantam preocupações quanto à possibilidade de transmissão interespecíes, incluindo a zoonótica.

Embora a maioria das estirpes do VIA não esteja associada a risco elevado à saúde humana, a ocorrência de mutações recentes e o surgimento de novos subtipos têm intensificado o estado de alerta entre as autoridades de vigilância sanitária (Brasil, 2025a). Nesse contexto, ainda que haja baixa incidência de infecção em humanos, dados divulgados pela OMSA indicam elevada gravidade

clínica, dado que, dos casos em humanos de infecção pelo vírus da gripe aviária H5N1 registrados até o momento, cerca de 48% evoluíram para óbito (WOAH, 2023).

Diante desse cenário, um estudo recente destacou a necessidade de ampliar o monitoramento para além do clado 2.3.4.4b, pois, apesar de este ser atualmente o mais preocupante, polimorfismos pontuais nos genes PB2 e PB1 também foram identificados em linhagens como o clado 2.3.2.1a. Essas observações sustentam a hipótese de transferência de genes internos por meio de clados intermediários, indicando um processo dinâmico de rearranjo genético. Ademais, os autores ressaltam a importância de não negligenciar outros subtipos virais, tendo em vista que o subtipo H5N6 pertencente ao clado 2.3.4.4, circulante na China, apresenta maior taxa de infectividade e elevada letalidade em humanos, assim como o H5N1 do clado 2.3.2.1c, responsável por múltiplos óbitos no Camboja (Deng *et al.*, 2025).

As implicações desses achados são amplas e reforçam a importância das ações de vigilância e controle promovidas por organismos internacionais. Os resultados sugerem que mamíferos podem atuar como potenciais hospedeiros intermediários do vírus H5N1 para humanos, o que exige fortalecimento da vigilância epidemiológica e o desenvolvimento de medidas integradas de biossegurança. Além disso, o monitoramento desses animais torna-se essencial para reduzir o risco de disseminação viral para outras espécies. Por fim, um dos principais desafios mencionados pelos autores refere-se à detecção do patógeno em amostras de *swab* obtidas de leões-marinhos; devido à natureza neurológica da infecção, a abordagem metodológica pode ser incapaz de identificar cargas virais baixas. Dessa forma, evidencia-se a necessidade de aprimorar métodos diagnósticos com maior sensibilidade e especificidade, além de viabilidade de aplicação em contextos remotos (Ulloa *et al.*, 2023; Araujo *et al.*, 2024).

1.3 Métodos de diagnóstico e subtipagem do VIA

No Brasil, a confirmação diagnóstica de infecção pelo vírus da IA segue protocolos específicos estabelecidos pela autoridade sanitária brasileira, compreendendo três abordagens metodológicas: recuperação do agente viral viável por técnicas de isolamento, detecção de ácido nucleico mediante transcrição reversa

seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) (padrão ouro), ou ainda, demonstração sorológica de resposta imunológica por meio de metodologias que evidenciem conversão de anticorpos (Brasil, 2024a).

Simultaneamente, orientações internacionais preconizam que indivíduos que desenvolvam manifestações clínicas compatíveis com conjuntivite viral ou síndrome respiratória aguda, contextualmente relacionadas a possível contato com a IAAP H5N1, devem ser submetidos a isolamento rigoroso e investigação laboratorial diagnóstica. Esta conduta estende-se também aos casos com resultado negativo ou positivo que permaneçam assintomáticos durante o período de vigilância, bem como àqueles em curso de intervenção terapêutica pós-exposição, independentemente do *status* clínico apresentado (CDC, 2025a).

Apesar da aprovação dos testes moleculares pela *Food and Drug Administration*, algumas recomendações são estabelecidas para que não haja perigo à saúde humana. Uma delas refere-se à prática de diagnóstico de rotina; esta não deve incluir o isolamento viral, pois vírus novos, classificados como agentes selecionados, possuem alta patogenicidade. Logo, devido à alta capacidade de causarem doenças graves aos humanos e ao risco ampliado de contaminação que a técnica expõe a quem a manuseia, apenas técnicas como a RT-qPCR e a detecção de antígenos são permitidas como detecção primária (CDC, 2025b).

Conforme protocolo estabelecido por Spackman (2020), diversas abordagens metodológicas viabilizam a identificação e caracterização subtípica do VIA, destacando-se a RT-qPCR. Implementações técnicas, como a incorporação de controles positivos de ácido ribonucleico exógeno (Xeno), mitigam resultados falsos-negativos; contudo, limitações operacionais substanciais persistem na implantação diagnóstica em contextos geográficos remotos e economicamente restritos. Os principais obstáculos incluem custos elevados de execução, exigência de recursos humanos especializados, demanda de infraestrutura laboratorial segregada com insumos dedicados para prevenção de contaminantes, fatores que impõem desvantagens significativas à viabilidade técnica em cenários de recursos limitados.

O teste sorológico de inibição da hemaglutinação, utilizado para detectar a soroconversão, constitui alternativa metodológica relevante para o mapeamento

epidemiológico, a caracterização antigênica, aplicações investigativas e a subtipagem do VIA. Entretanto, fenômenos como reações cruzadas antigênicas ou contaminação cruzada podem comprometer a confiabilidade diagnóstica, gerando resultados discordantes, como falsos-positivos quando se prioriza a sensibilidade analítica ou falsos-negativos quando se objetiva maior especificidade do teste (Spackman, 2020).

A convergência destes desafios operacionais aponta para a necessidade urgente de pesquisas que desenvolvam novas estratégias diagnósticas, capazes de superar as limitações apresentadas sem comprometer a qualidade dos resultados em termos de sensibilidade e especificidade.

1.4 Biossensores como método diagnóstico

O desenvolvimento de metodologias diagnósticas rápidas, econômicas e específicas representa um desafio crítico na detecção de doenças infecciosas. Os biossensores baseados em *toehold switches* utilizam detecção por reconhecimento de sequência RNA/DNA, destacando-se pela elevada sensibilidade, rapidez na detecção e com possibilidade de aplicação em campo, características altamente importantes em um método para vigilância da IA. A pesquisa de Pardee *et al.* (2014) demonstrou que sensores *toehold* para o vírus Ebola apresentam aceleração de cerca de 360 vezes no tempo de desenvolvimento e redução de até 714 vezes nos custos comparado ao desenvolvimento de anticorpos personalizados, o que o torna uma tecnologia viável para laboratórios com recursos limitados.

O grupo liderado por Pardee *et al.* (2016) aprimorou seu estudo anterior ao desenvolver um biossensor destinado ao diagnóstico do vírus da Zika e incorporar avanços importantes em sensibilidade e especificidade. A abordagem inovadora utilizou amplificação isotérmica de ácidos nucleicos (NASBA), uma técnica que dispensa a necessidade de ciclos térmicos complexos, o que permite a detecção de material genético viral em plataformas portáteis compactas, baseadas em sistemas livres de células liofilizadas.

A implementação de biossensores acoplados ao método NASBA demonstrou eficácia na detecção do vírus da Hepatite A mediante amplificação do gene *superfolder green fluorescent protein (sfGFP)*. A integração dessas metodologias

resultou em aprimoramento significativo dos parâmetros analíticos, particularmente no que concerne ao limite de detecção, que alcançou incremento de sensibilidade na ordem de 5000 vezes em relação ao biossensor isolado. Tais resultados evidenciam que a convergência de diferentes abordagens analíticas potencializa os desempenhos quantificáveis em sistemas de biodetecção molecular (Kang *et al.*, 2023).

1.4.1 *Toehold switches*

Os *toehold switches* são RNAs regulatórios sintéticos desenvolvidos a partir de estudos que demonstram a influência das estruturas secundárias na tradução do mRNA, fundamentando-se em princípios de termodinâmica e cinética de RNAs. Esses dispositivos são compostos por duas fitas de RNA que interagem de forma programável: o interruptor (*switch*) e o gatilho (*trigger*) se anelam para modular a expressão gênica. O RNA *switch* contém uma estrutura secundária (*hairpin*) que oculta o sítio de ligação do ribossomo (RBS) e o códon de iniciação (AUG), o que por sua vez, impede a tradução do gene repórter acoplado à jusante. Essa estrutura inclui ainda uma sequência conectora (*linker*) e um domínio de ancoragem complementar ao RNA *trigger*. Quando a sequência-alvo está presente, o RNA *trigger* hibridiza-se com o *switch*, promovendo a abertura do *hairpin*; expondo a região RBS e o códon de início, o que ativa a tradução do gene repórter, conforme ilustrado na Figura 4 (Green *et al.*, 2014; Pardee *et al.*, 2016; Hunt *et al.*, 2022).

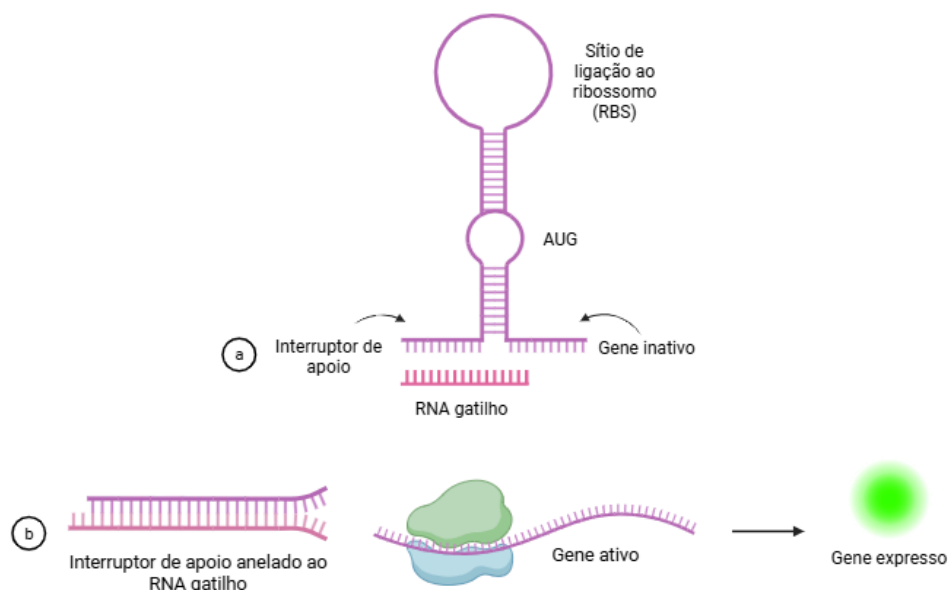


Figura 4. Mecanismo de funcionamento do *toehold switch*. a: *hairpin* estruturado contendo o gene inativo, sem o anelamento do RNA *trigger* ao *toehold switch*. b: após o anelamento do RNA *trigger* ao *toehold switch*, o *hairpin* desestrutura-se expondo o RBS juntamente com o AUG, o qual ativa a expressão do gene repórter. Fonte: Adaptada de Merle (2021). Produzida em BioRender.

A exploração e o aprimoramento contínuo dos *designs* dos *toehold switches* ampliam seu potencial de aplicação, abrangendo desde a regulação gênica *in vitro* até a construção de circuitos biológicos complexos, capazes de reprogramar células vivas. Essa versatilidade possibilita a modulação precisa de genes e proteínas, pois o acoplamento da técnica a outras ferramentas permite o desenvolvimento de diversas aplicações e modelos que exibem resposta rápida e rigorosamente controlada (Green *et al.*, 2014).

A funcionalidade supracitada é demonstrada pelo trabalho de Pardee *et al.* (2014), que evidenciou como a estabilidade e a adaptabilidade das construções baseadas em *toehold switches* possibilitam a criação de diversos produtos e investigações. Ao se implementar esses circuitos sintéticos em plataformas de papel liofilizado, o sistema ganha em economia e estabilidade, o que demonstra alto potencial para vigilância e aplicações industriais, requisitos cruciais para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas, por exemplo.

A flexibilidade estrutural e funcional dos *toehold switches*, associada à capacidade de modular seletivamente a interação molecular com diferentes alvos genéticos, confere a essa tecnologia um elevado potencial de adaptação para a detecção de diversos patógenos de importância epidemiológica. Essas plataformas

diagnósticas de nova geração ampliam o acesso a métodos de detecção molecular em ambientes com recursos limitados, a qual permite a democratização do diagnóstico em escala global. O desenvolvimento de sistemas que conciliam rapidez analítica, baixo custo e escalabilidade produtiva representa uma estratégia promissora para a consolidação de redes de vigilância descentralizadas e para a identificação precoce de infecções. Dessa forma, os *toehold switches* despontam como ferramentas-chave para o fortalecimento de respostas sanitárias ágeis, eficazes e acessíveis, especialmente em contextos de saúde pública (Baabu *et al.*, 2022).

1.4.2 Serina integrases sítio-específicas

Adicionalmente, o avanço da técnica não se restringe apenas aos estudos termodinâmicos e computacionais que guiam sua programabilidade, mas também depende de estratégias que permitam a projeção de circuitos genéticos com maior precisão e previsibilidade. A utilização de módulos amplificadores de sinal, por exemplo, possibilita a diminuição da taxa de vazamento (*leakage*) no estado *OFF* (ausência da sequência-alvo no sistema). Tal otimização eleva a confiabilidade da engenharia e aprimora significativamente a sensibilidade e especificidade do *design* programado (Franco *et al.*, 2023).

As serina integrases são recombinases originalmente identificadas em bacteriófagos, onde desempenham papel fundamental no ciclo lisogênico ao mediar a integração do genoma viral ao DNA bacteriano. Essa integração ocorre por meio do reconhecimento específico de sequências-alvo; o sítio *attB* presente na bactéria e o sítio *attP* presente no fago, após a recombinação entre essas duas regiões, formam-se os sítios híbridos *attL* e *attR*, que delimitam o DNA integrado no hospedeiro (Figura 5) (Sales *et al.*, 2025).

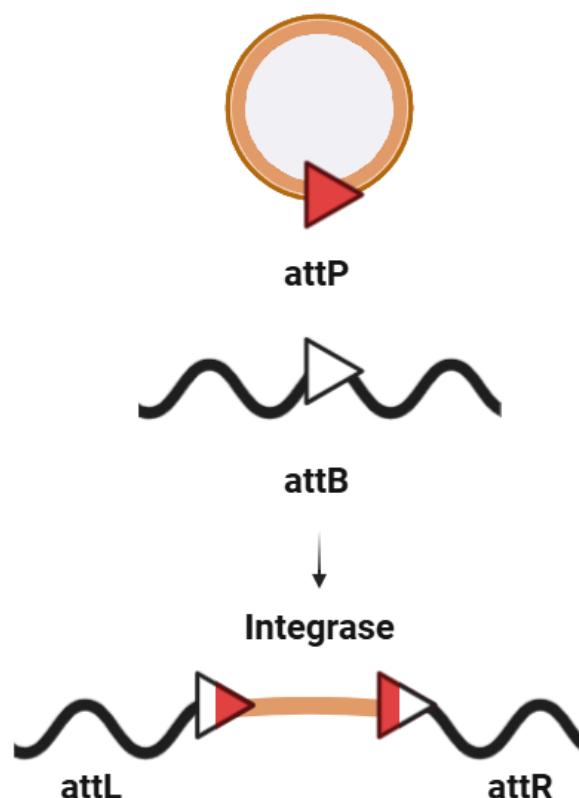


Figura 5. Esquema da integração sítio-específica mediada por integrase entre os sítios *attP* e *attB*. Representação do processo de recombinação entre o sítio *attP* (plasmidial ou fágico) e o sítio *attB* (genômico), catalisado pela integrase, resultando na formação dos sítios híbridos *attL* e *attR* após a integração do elemento genético ao DNA hospedeiro. Fonte: Adaptada de Gomide, 2020. Produzida em BioRender.

Devido à sua alta especificidade, eficiência e ortogonalidade as serina integrases tornaram-se ferramentas valiosas de biotecnologia, especialmente em aplicações de engenharia genética e biologia sintética. Elas são amplamente utilizadas na construção e modulação de circuitos genéticos, as quais permitem o controle preciso da expressão ou repressão de genes e vias metabólicas. Dependendo da recombinase empregada é possível integrar, deletar ou inverter segmentos de DNA ou de outras moléculas-alvo de forma direcionada. Essa versatilidade permite criar diferentes tipos de reações e combinações (Gomide, 2020; Sales *et al.*, 2025).

A aplicabilidade dessas enzimas estende-se desde experimentos *in vivo* em organismos procarióticos, como *Escherichia coli* (*E. coli*), até sistemas eucarióticos complexos. Wang *et al.* (2023) demonstraram que as serina integrases podem ser usadas para manipular plasmídeos em *E. coli*, obtendo expressão constitutiva de

três proteínas fluorescentes distintas. Em sistemas eucariontes, Weinberg *et al.* (2017) empregaram essas enzimas no desenvolvimento da plataforma *Boolean Logic and Arithmetic through DNA Excision* (BLADE), baseada em operações de lógica booleana mediada por recombinação. Dos 113 circuitos projetados, aproximadamente 96% apresentaram desempenho conforme o previsto, o que demonstra a robustez do método. Diferentemente de sistemas baseados exclusivamente em fatores de transcrição, o uso de serina integrases permite regulação genética simultânea e previsível sem necessidade de múltiplos sítios promotores.

Gomide *et al.* (2020) avaliaram experimentalmente a funcionalidade das serina integrases 2, 4, 5, 7, 9 e 13 em circuitos genéticos por meio da quantificação da fluorescência da proteína *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) e da análise molecular da formação dos sítios recombinados *attL* e *attR*. Segundo os autores, a serina integrase 13 (Int13) apresentou correta formação dos sítios e destacou-se por gerar o maior número de células positivas para EGFP dentre as enzimas avaliadas. Posteriormente, Franco *et al.* (2023) empregaram a Int13 como elemento condicional em circuitos genéticos, nos quais a enzima atua como uma “porta lógica” biológica. Nesse sistema, a expressão da proteína-alvo depende da presença de uma molécula específica que desencadeia a tradução da Int13. Uma vez expressa, a enzima promove a inversão do promotor da T7 RNA polimerase, resultando na ativação do gene repórter. Essa estratégia minimiza a expressão basal indesejada e aumenta a precisão do controle genético.

1.4.3 Plataformas de expressão gênica em sistemas livre de células (*cell-free systems*)

Durante a década de 1960, Nirenberg e Matthaei (1961) realizaram experimentos pioneiros que demonstraram a possibilidade de promover a síntese proteica em sistemas acelulares, ou seja, sem a necessidade da estrutura de uma célula intacta. Essa descoberta foi um marco fundamental para a elucidação do código genético e abriu caminho para o desenvolvimento das modernas plataformas de expressão gênica livre de células. Essas plataformas constituem atualmente uma ferramenta versátil para a investigação e produção de proteínas em ambientes

controlados e altamente personalizáveis. Tal abordagem permite a síntese rápida de RNA e proteínas a partir de um número reduzido de componentes, minimizando interferências e contaminações associadas a sistemas celulares (Rocha *et al.*, 2025).

A escolha adequada da plataforma é essencial para o sucesso da síntese de proteínas livre de células (*Cell-Free Protein Synthesis* - CFPS), uma vez que os componentes necessários à reação como enzimas, ribossomos e fatores de transcrição e tradução são derivados do microrganismo selecionado. Nesse contexto, Gregório, Levine e Oza (2019) propuseram um guia comparativo das plataformas de alta e baixa adoção, este guia auxilia na etapa de seleção do sistema mais apropriado às finalidades experimentais. Independentemente da plataforma utilizada, o processo de síntese proteica segue etapas básicas comuns. Primeiramente, seleciona-se a linhagem celular destinada ao cultivo; em seguida, as células são lisadas para a obtenção da maquinaria de transcrição e tradução, o que inclui os ribossomos e demais fatores necessários. O extrato resultante é então empregado na montagem do sistema CFPS, onde ocorre a síntese *in vitro* da proteína de interesse.

Levine *et al.* (2019) desenvolveram um protocolo acessível para realizar a CFPS, com o objetivo de viabilizar sua implementação em laboratórios de pesquisa por profissionais não especialistas. O grupo utilizou o plasmídeo pJL1-*sfGFP* como molde para a expressão da proteína repórter sfGFP, a partir de condições otimizadas e padronizadas experimentalmente. O rendimento obtido foi de aproximadamente 2 mL de extrato celular bruto por litro de cultura bacteriana, volume suficiente para a realização de cerca de 400 reações de 15 µL cada. A concentração média de proteína expressa atingiu 900 µg/mL, com um custo estimado de US\$ 0,021 por µg de proteína, considerando exclusivamente os reagentes utilizados.

O protocolo otimizado inclui cuidados específicos durante a lise celular por sonicação, etapa crítica para preservar a integridade da maquinaria de transcrição e tradução. O controle térmico é fundamental para evitar a desnaturação das proteínas funcionais, logo, recomenda-se a imersão da amostra em banho de gelo durante o processo. A centrifugação a $18.000 \times g$ demonstrou maior eficiência na separação entre sobrenadante e *pellet*, o que contribuiu para a obtenção de extratos mais reprodutíveis. Além disso, o ajuste da concentração de Mg^{2+} ao final do preparo

mostrou-se eficaz na padronização entre diferentes lotes de extrato. A análise de custo-benefício realizada pelos autores indicou um investimento inicial aproximado de US\$ 7.700, incluindo reagentes e equipamentos especializados. Apesar do custo inicial, o sistema apresenta alta escalabilidade, excelente rendimento e reprodutibilidade além de permitir a operação por pessoal com treinamento laboratorial básico (Levine *et al.*, 2019).

Rocha *et al.* (2025) publicaram dados sobre a expressão de proteínas em sistema *cell-free* produzidas *in home* com sucesso, os resultados evidenciam o potencial uso da técnica para expressar proteínas ativas e funcionais sem o uso de células vivas, o que possibilita o controle e otimização da reação. Logo, ao estabelecer o protocolo de CFPS em laboratório, o sistema é capaz de produzir proteínas citotóxicas e proteínas com um certo nível de complexidade como estratégia alternativa ao uso de kits comerciais onerosos.

Dessa forma, considerando a elevada taxa de mutação e dispersão geográfica do vírus da IAAP, bem como seu impacto sanitário e econômico, torna-se evidente a necessidade de métodos diagnósticos rápidos, sensíveis e aplicáveis em contextos descentralizados. Estratégias baseadas em biologia sintética, especialmente aquelas integradas a plataformas livres de células, como os *toehold switches*, emergem como alternativas promissoras para ampliar a capacidade de vigilância epidemiológica em tempo real. Nesse contexto, o uso de ferramentas sintéticas programáveis apresenta potencial prático para contribuir com o avanço da detecção do VAI em paralelo à evolução dinâmica do vírus.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho, objetivou-se avaliar um biossensor para diagnóstico do VAI integrando diferentes ferramentas da biologia sintética, como os *toehold switches*, sistemas livres de células e uso da Int13 como elemento de redução do sinal basal.

2.1 Objetivo geral

Avaliar experimentalmente a viabilidade de um biossensor baseado em *toehold switches* acoplado a sistemas de expressão gênica livres de células para detecção de sequências-alvo dos genes H5 e N1 do vírus da gripe aviária.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar regiões conservadas dos genes HA (H5) e NA (N1) do subtipo H5N1 e desenhar *toehold switches* correspondentes;
- Construir e validar plasmídeos contendo módulos de detecção (*switches*) e de resposta (luciferase) para uso em reações *cell-free*;
- Realizar a triagem inicial dos *switches* H5 e N1 com RNA *trigger*, comparando o desempenho luminescente dos candidatos;
- Refinar a quantidade total de DNA e a proporção entre módulos de detecção e resposta para os *switches* selecionados;
- Testar a reprodutibilidade do sistema e caracterizar o comportamento dose-dependente do sinal;
- Investigar o impacto de degradação de RNA e de RNases no desempenho do biossensor, incluindo o uso de alíquotas únicas de DNA e inibidor de RNase nas reações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Escolha das sequências de RNA alvo e *design* dos *toehold switches*

As sequências dos nucleotídeos de referência utilizadas neste estudo foram obtidas a partir do banco de dados GenBank do Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI). Para o gene da hemaglutinina (HA, subtipo H5), foi utilizada como sequência base o registro CY091961.1, correspondente ao gene completo da hemaglutinina do vírus Influenza A subtipo H5N1. A região codificadora (*Coding DNA Sequence* - CDS) deste registro compreende os nucleotídeos 14 a 1720, sendo a proteína traduzida correspondente registrada sob o identificador AEH59221.1.

Com o objetivo de representar a variabilidade genética do subtipo H5, foi realizada uma busca por similaridade utilizando a ferramenta BLASTn do NCBI, empregando CY091961.1 como sequência de consulta. Foram selecionadas 100

sequências completas da CDS do gene HA (H5). O conjunto de sequências utilizado no alinhamento múltiplo compreendeu isolados coletados entre 2005 e 2008, período epidemiologicamente associado à ampla disseminação do subtipo H5N1 no Sudeste Asiático, permitindo representar a variabilidade intra-subtipo em um cenário endêmico consolidado. Desse modo, o alinhamento múltiplo foi realizado por meio do *software* MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*), utilizando parâmetros padrões (Figura A1). A partir do alinhamento, foi realizada a análise da frequência nucleotídica posição a posição ao longo da CDS, permitindo a identificação de regiões conservadas. Para definição da sequência-alvo do gene H5, adotou-se o critério de seleção de uma região contínua de 40 nucleotídeos com identidade mínima de 78%, a região selecionada corresponde aos nucleotídeos 354-393 da CDS (Quadro 1).

De maneira análoga, para o gene da neuraminidase (NA, subtipo N1), foi utilizada como sequência referência o registro AF216738.1, correspondente à neuraminidase 1 do vírus Influenza A, cuja CDS está compreendida entre os nucleotídeos 5 e 1414. A proteína traduzida correspondente encontra-se registrada sob o identificador AAG01226.1 no GenBank. A partir da sequência AF216738.1, foi realizada uma busca por similaridade por meio da ferramenta BLASTn, sendo selecionadas sequências completas da CDS do gene N1 para compor o conjunto de análise. As sequências selecionadas para o gene N1 correspondem a cepas clássicas de Influenza A (H5N1), isoladas predominantemente no início dos anos 2000, período que marcou a expansão do vírus altamente patogênico na Ásia. O conjunto é composto majoritariamente por isolados aviários provenientes de Hong Kong e de outras regiões do sudeste asiático e compreende CDS completas do segmento que codifica a neuraminidase N1, assegurando representatividade das variantes epidemiologicamente relevantes circulantes à época. O alinhamento múltiplo foi conduzido utilizando o mesmo procedimento descrito para H5, enquanto a região-alvo selecionada para o gene N1 corresponde aos nucleotídeos 1359-1398 da CDS (Quadro 1) (Figura A2).

Quadro 1. Sequências de nucleotídeos correspondentes aos alvos dos genes H5 e N1 do vírus Influenza A (H5N1). Sequências nucleotídicas dos fragmentos utilizados como alvos moleculares, apresentadas no sentido 5'-3', referentes às regiões codificadoras do subtipo H5N1.

H5	5' -ATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTT-3'
N1	5' -CTGTGGGTGGTCTTGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATT-3'

A partir dos alvos selecionados foi realizada a conversão das sequências para suas respectivas fitas complementares reversas, em seguida, o *design* dos *toehold switches* foi construído utilizando o *Software The Nucleic Acid Package* (NUPACK) com parâmetros e *script* pré-definidos por Franco *et al.* (2023), os quais encontram-se descritos nos anexos deste estudo. O *software* foi escolhido por permitir a predição e otimização de estruturas secundárias de RNA, a fim de avaliar a estabilidade termodinâmica e a formação adequada das regiões de pareamento necessárias ao funcionamento dos *switches* (Green *et al.*, 2014; Pardee *et al.*, 2016).

Foram gerados três *switches* para cada glicoproteína, H5 e N1, cujas estruturas previstas e sequências correspondentes estão apresentadas nas Figuras 6a-f e Quadros 2a-f, respectivamente. Durante o processo de *design*, alguns nucleotídeos foram substituídos para remover códons de parada que poderiam resultar na síntese de proteínas truncadas. Para mitigar esse risco, foram alterados dois e três nucleotídeos nas sequências finais, conforme demonstrado nos Quadros 2e-f. Os nucleotídeos destacados em vermelho indicam as bases removidas, enquanto os marcados em verde representam as inserções realizadas.

A estabilidade estrutural e a eficiência de interação entre *switch* e *trigger* foram avaliadas utilizando o *software* NUPACK, por meio da análise de complexos RNA-RNA. Foi utilizado como parâmetro de seleção o defeito de conjunto normalizado, que representa a fração média de nucleotídeos que não se encontram na conformação estrutural alvo dentro do conjunto termodinâmico (*ensemble*) previsto pelo modelo de energia do RNA. Os valores fornecidos pelo programa foram convertidos em porcentagem, sendo adotado como critério de seleção estruturas com defeito inferior a 20%. Dessa forma, os sensores apresentaram as seguintes taxas de erro: 11,9%, 12,5%, 11,9%, 17,3%, 17,2% e 16,7%, correspondentes, respectivamente, aos *switches* H5-a, H5-b, H5-c, N1-d, N1-e e N1-f.

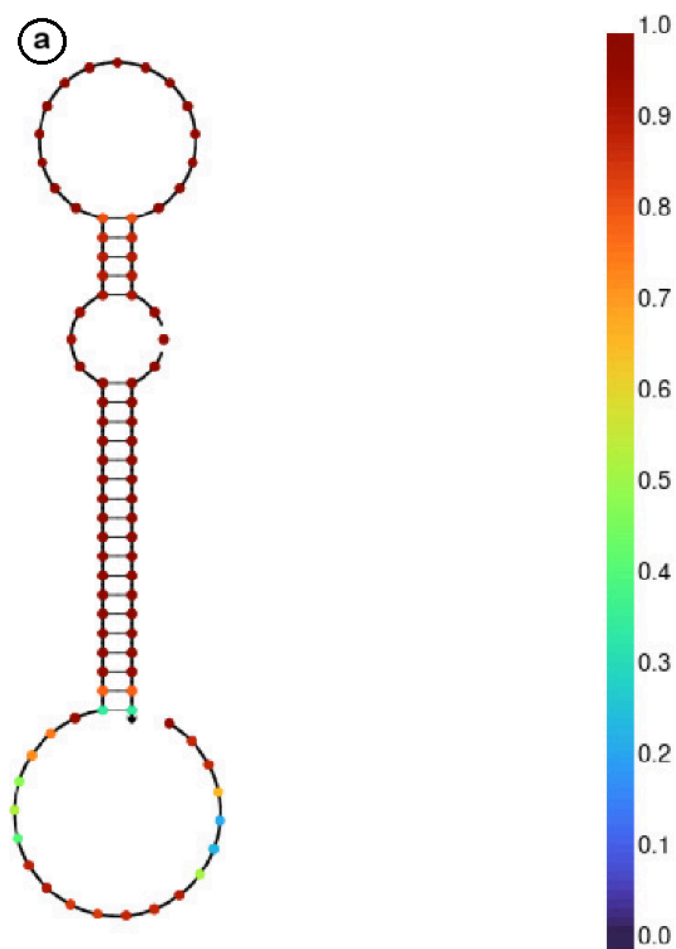


Figura 6a. *Hairpin* previsto para a primeira sequência do subtipo H5 (H5-a), gerada pelo *software* NUPACK. A coloração dos nucleotídeos corresponde à probabilidade de pareamento estrutural predita termodinamicamente, variando de 0 (azul, baixa probabilidade de pareamento) a valores próximos de 1 (vermelho, alta probabilidade de pareamento), conforme indicado na escala lateral.

Quadro 2a. Primeira sequência do subtipo H5 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura *hairpin* apresentada anteriormente. As sequências estão apresentadas no sentido 5'→3'.

a	5' -AAATGGTTTATTCTGCTCAATAGGTGTTTCAGTTCTTCATGTATGTGGGAGAGAAGAGGAGATATGAT GGAAGAACTGAAACACTTG-3'
----------	--

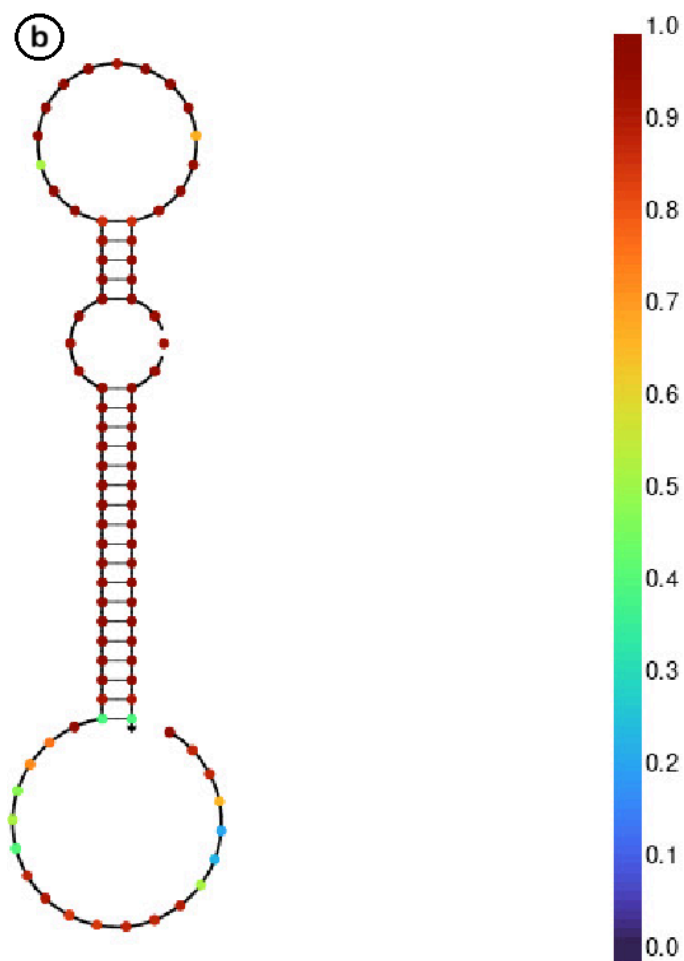


Figura 6b. *Hairpin* previsto para a segunda sequência do subtipo H5 (H5-b), gerada pelo *software* NUPACK. A coloração dos nucleotídeos corresponde à probabilidade de pareamento estrutural predita termodinamicamente, variando de 0 (azul, baixa probabilidade de pareamento) a valores próximos de 1 (vermelho, alta probabilidade de pareamento), conforme indicado na escala lateral.

Quadro 2b. Segunda sequência do subtipo H5 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura *hairpin* apresentada anteriormente. As sequências estão apresentadas no sentido 5'→3'.

b	5' -AAATGGTTTATTCTGCTCAATAGGTGTTTCAGTTCTTCATGCATGTGACGAGAGAGAGGAGATATGATGG AAGAACTGAAACACCTG-3'
----------	--

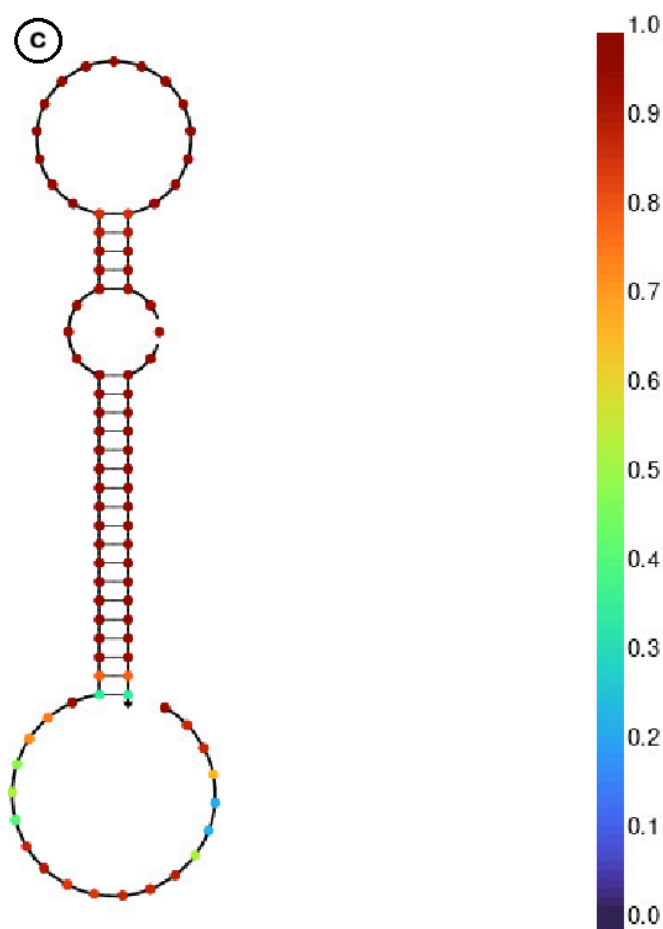


Figura 6c. *Hairpin* previsto para a terceira sequência do subtipo H5 (H5-c) gerada pelo *software* NUPACK. A coloração dos nucleotídeos corresponde à probabilidade de pareamento estrutural predita termodinamicamente, variando de 0 (azul, baixa probabilidade de pareamento) a valores próximos de 1 (vermelho, alta probabilidade de pareamento), conforme indicado na escala lateral.

Quadro 2c. Terceira sequência do subtipo H5 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura *hairpin* apresentada anteriormente. As sequências estão apresentadas no sentido 5'→3'.

c	5' -AAATGGTTTATTCTGCTCAATAGGTGTTTCAGTTCTTCATGATATTGAGGAGGAAGAGGAGAATATATGG AAGAACTGAAACACTTG-3'
----------	--

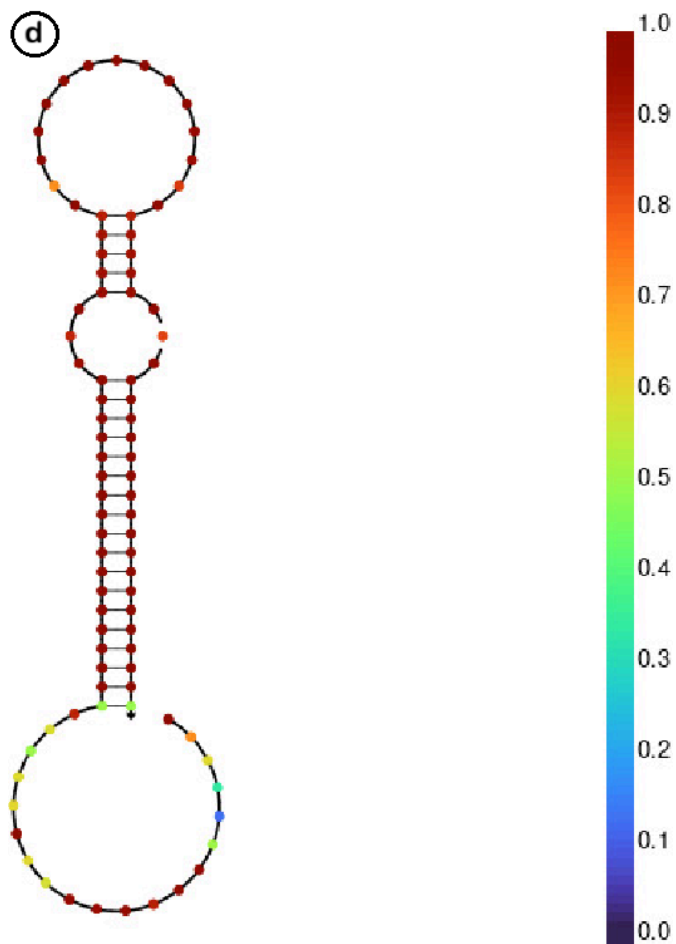


Figura 6d. *Hairpin* previsto para a primeira sequência do subtipo N1 (N1-d) gerada pelo *software* NUPACK. A coloração dos nucleotídeos corresponde à probabilidade de pareamento estrutural predita termodinamicamente, variando de 0 (azul, baixa probabilidade de pareamento) a valores próximos de 1 (vermelho, alta probabilidade de pareamento), conforme indicado na escala lateral.

Quadro 2d. Primeira sequência do subtipo N1 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura *hairpin* apresentada anteriormente. As sequências estão apresentadas no sentido 5'→3'.

d	5' -AATGGCAACTCAGCACCGTCTGGCCAAGACCAACCCACAGGTATGTATGAGAAGAGAGGAGATATGATGG TGGGTTGGTCTTGGCCA-3'
----------	--

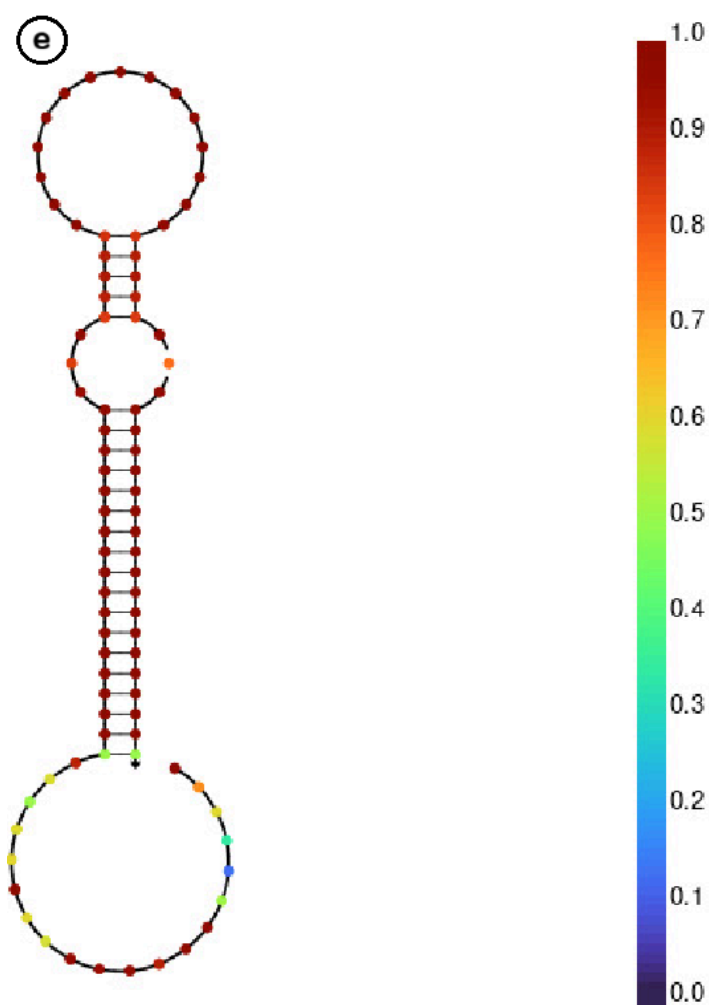


Figura 6e. *Hairpin* previsto para a segunda sequência do subtipo N1 (N1-e) gerada pelo *software* NUPACK. A coloração dos nucleotídeos corresponde à probabilidade de pareamento estrutural predita termodinamicamente, variando de 0 (azul, baixa probabilidade de pareamento) a valores próximos de 1 (vermelho, alta probabilidade de pareamento), conforme indicado na escala lateral.

Quadro 2e. Segunda sequência do subtipo N1 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura *hairpin* apresentada anteriormente. As sequências estão apresentadas no sentido 5'→3'. As variações destacadas em cores indicam modificações pontuais realizadas na sequência para evitar a produção de *stop códons* e proteínas truncadas.

e.1	5' -AATGGCAACTCAGCACCGTCTGGCCAAGACCAACCCACAGGTTATGAGGGAGAAAGAGGAGTATGGA TGGTGGGTTGGTCTTGGCCA-3'
e.2	5' -AATGGCAACTCAGCACCGTCTGGCCAAGACCAACCCACAGGTTATGAGGGAGAAAGAGGAGTAATGA TGGTGGGTTGGTCTTGGCCA-3'

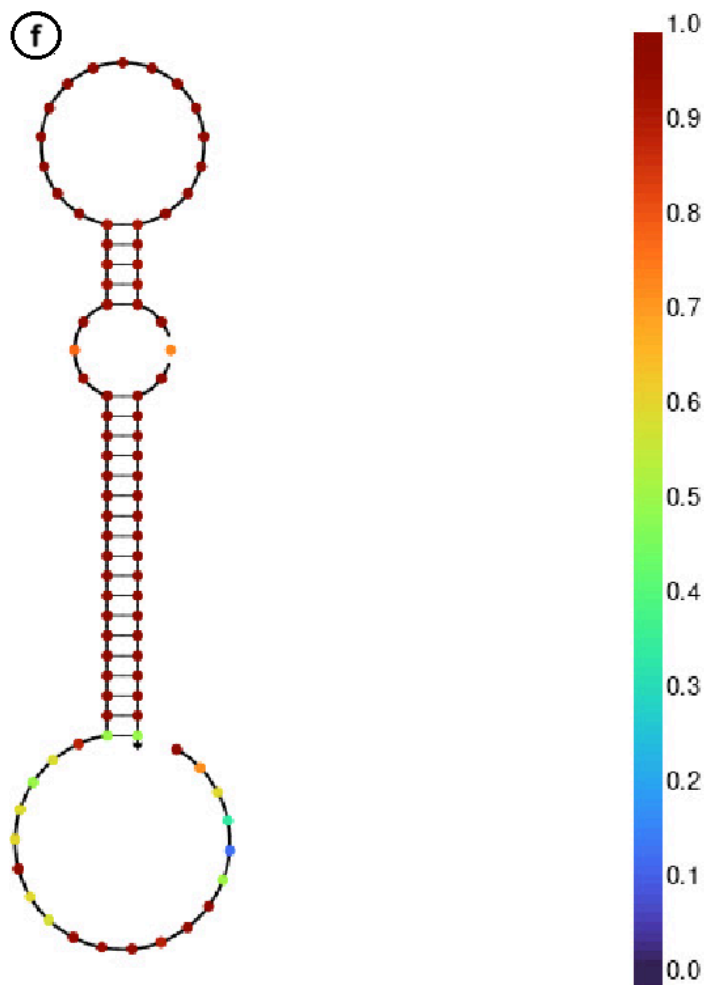


Figura 6f. *Hairpin* previsto para a terceira sequência do subtipo N1 (N1-f) gerada pelo *software* NUPACK. A coloração dos nucleotídeos corresponde à probabilidade de pareamento estrutural predita termodinamicamente, variando de 0 (azul, baixa probabilidade de pareamento) a valores próximos de 1 (vermelho, alta probabilidade de pareamento), conforme indicado na escala lateral.

Quadro 2f. Terceira sequência do subtipo N1 gerada pelo NUPACK correspondente à estrutura *hairpin* apresentada anteriormente. As sequências estão apresentadas no sentido 5'→3'. As variações destacadas em cores indicam modificações pontuais realizadas na sequência para evitar a produção de *stop códons* e proteínas truncadas.

f.1	5' -AATGGCAACTCAGCACCGTCTGGCCAAGACCAACCCACAGGATGTAAGAGAGAGAGAGGAGTA TGTA TGGTGGGTTGGTCTTGGCCA-3'
f.2	5' -AATGGCAACTCAGCACCGTCTGGCCAAGACCAACCCACAGGATGTAAGAGAGAGAGAGGAGTA ATGA TGGTGGGTTGGTCTTGGCCA-3'

3.2 Síntese dos RNAS *trigger* e construção dos plasmídeos

Os *primers forward* e *reverse* referentes a cada região alvo projetada foram desenhados contendo, adicionalmente, a sequência da região promotora da T7 RNA polimerase (Quadro 3). Cada par de *primers* foi anelado às temperaturas de 67 °C e

75 °C, por 20 minutos, para os genes HA e NA, respectivamente, produzindo DNA dupla fita (*Double-Stranded DNA* - dsDNA) molde para transcrição dos RNAs *trigger*.

Quadro 3. Sequências dos *primers forward* e *reverse* utilizados para anelamento das regiões alvo dos genes H5 e N1 do vírus Influenza A (H5N1). Os oligonucleotídeos foram desenhados contendo, na extremidade 5', a sequência promotora da T7 RNA polimerase, permitindo a obtenção de dsDNA molde para posterior transcrição *in vitro* dos RNAs *trigger*. As sequências estão apresentadas no sentido 5'-3'.

Primer Forward H5	5' -GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAA TAAACCATTTTAA-3'
Primer Reverse H5	5' -TTAAAAATGGTTTATTCTGCTCAATAGGTGTTTCAGTTCTTCATTCTCCCTATAGTGA GTCGTATTAATTTC-3'
Primer Forward N1	5' -GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTG AGTTGCCATTTTAA-3'
Primer Reverse N1	5' -TTAAAAATGGCAACTCAGCACCGTCTGGCCAAGACCAACCCACAGTCTCCCTATAGTGA GTCGTATTAATTTC-3'

Os RNAs *trigger* foram transcritos a partir do dsDNA molde, e a reação de transcrição *in vitro* foi realizada utilizando o kit *RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems* (Promega), com incubação *overnight* a 37 °C. Por conseguinte, a RNA polimerase foi inativada a 70 °C por 20 minutos e as amostras provenientes da transcrição foram tratadas com RQ1 *RNase-Free DNase* (Promega) a 37 °C por 2 horas. Por fim, os RNAs foram purificados utilizando o protocolo de purificação com etanol absoluto e ressuspensos em água livre de nucleases.

A estratégia baseada em *toehold switch* foi estruturada em um sistema de dois plasmídeos independentes, funcionalmente complementares. O primeiro plasmídeo, correspondente ao módulo de detecção, foi projetado para conter o circuito regulatório responsivo à sequência-alvo do vírus, sendo construídos modelos sintéticos específicos para os segmentos HA e NA (H5N1). Esse plasmídeo inclui a região regulatória composta pela sequência do *toehold switch*, contendo o sítio RBS e o AUG inicialmente sequestrados na estrutura secundária do RNA, permitindo ativação translacional apenas na presença do RNA alvo. A jusante do circuito regulatório foi inserida a sequência codificante da proteína repórter Int13, responsável pela sinalização do evento de detecção.

Para a construção do módulo de detecção, utilizou-se o plasmídeo pSB1C3 como *backbone*, contendo origem de replicação pMB1 e marcador de resistência à cloranfenicol (CmR) (Figura 7).

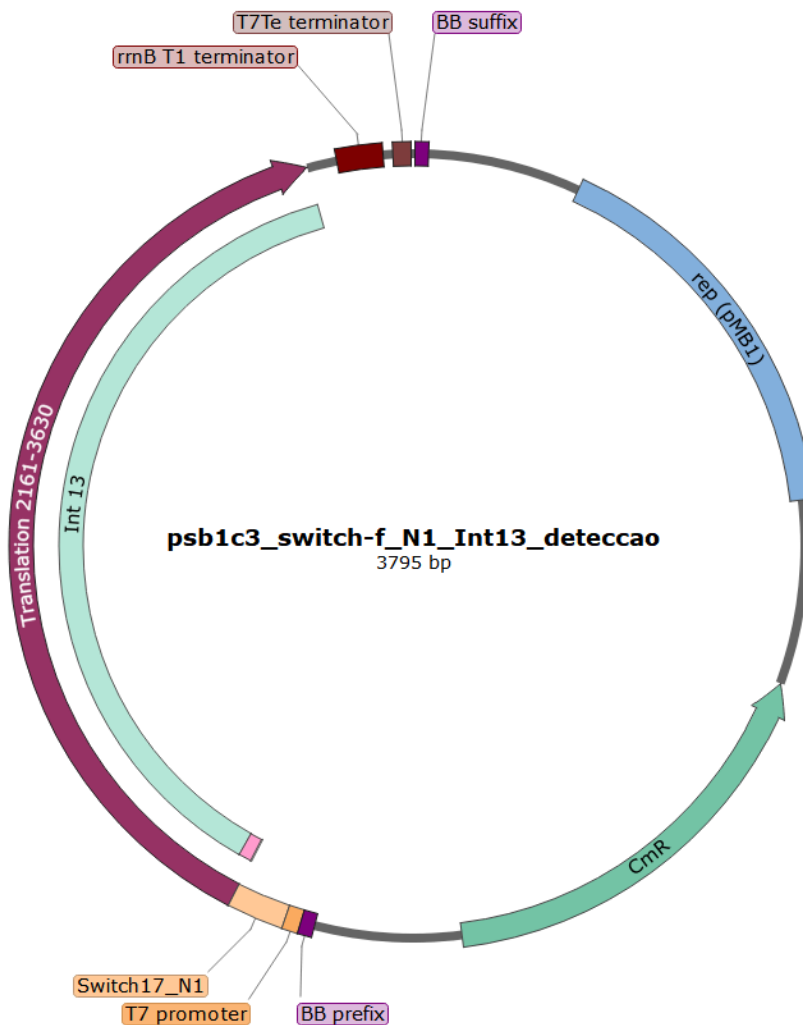


Figura 7. Plasmídeo correspondente ao módulo de detecção do sistema *toehold switch*. O backbone pSB1C3 (3795 bp) contém origem de replicação pMB1 e marcador de resistência à cloranfenicol (CmR). O circuito regulatório inclui a sequência do *toehold switch* posicionada a montante da proteína intermediária Int13. Em um sistema de dois plasmídeos, este módulo atua como componente sensor, sendo ativado especificamente pela presença do RNA alvo (H5 ou N1), posteriormente ocorre a ativação translacional do *switch*, permitindo a expressão da Int13, que atuará sobre o módulo de resposta.

O módulo de resposta foi projetado para converter o evento de detecção molecular em sinal luminescente. Para isso, o promotor da T7 RNA polimerase foi inserido em orientação reversa e flanqueado pelos sítios de recombinação *attP* e *attB* da Int13. Na ausência de recombinação, o gene da *luciferase* permanece transcricionalmente inativo. A expressão do gene repórter ocorre somente após a ação da Int13 expressa pelo módulo de detecção, que promove o rearranjo do promotor T7, permitindo sua correta orientação e subsequente ativação da transcrição. A produção dos *switches* foi baseada nas construções de Franco e colaboradores (2023).

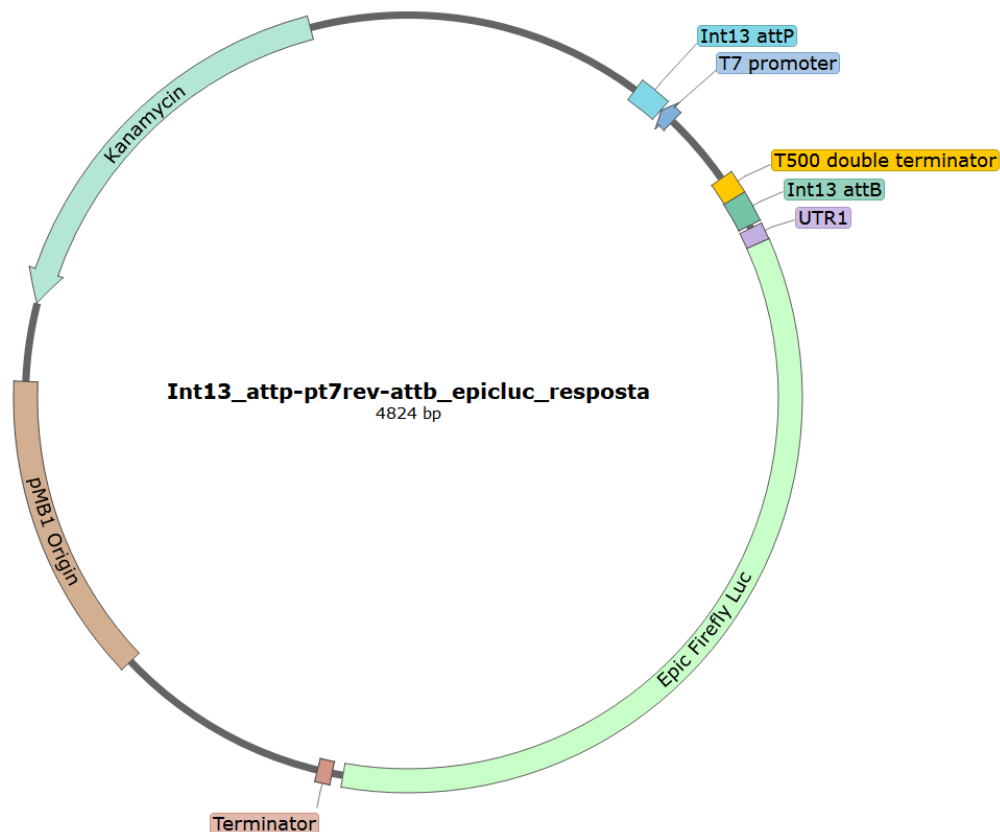


Figura 8. Plasmídeo correspondente ao módulo de resposta do sistema *toehold switch*. A construção foi projetada em *backbone* derivado de pUC (4824 pb), contendo origem de replicação pMB1 e marcador de resistência à canamicina. O gene da *luciferase* (*Epic Firefly Luc*) encontra-se sob controle de um promotor da T7 RNA polimerase orientado em sentido reverso e flanqueado pelos sítios de recombinação *attP* e *attB* reconhecidos pela Int13. A recombinação mediada pela enzima promove o rearranjo do promotor T7, possibilitando a ativação da expressão da luciferase e a geração do sinal luminescente.

3.3 Clonagem dos plasmídeos em *E. coli* DH5α

Os plasmídeos foram clonados em *E. coli* DH5α por meio do protocolo de transformação por choque térmico. Cerca de 20 ng de plasmídeo foram adicionados a 100 µL de células DH5α, as quais passaram previamente por protocolo quimiocompetente ao utilizar solução de CaCl₂. A mistura foi deixada em banho de gelo por 30' e posteriormente submetida à incubação em banho Maria a 37 °C por 45". Em seguida, as amostras foram imediatamente recolocadas em banho de gelo por 2', depois foram recuperadas com 500 µL de meio Luria Bertani (LB) líquido e incubadas a 37 °C por 1h a 180 rpm em agitador *shaker* (*Infors HT Ecotron Incubator Shaker*).

Alíquotas de 100 µL de células transformadas foram espalhadas em placas previamente preparadas com 20 mL de meio LB sólido e os respectivos antibióticos de seleção. Dessa forma, utilizou-se 25 mg/mL de cloranfenicol para o plasmídeo que contém o gene-alvo (módulo de detecção) e 50 mg/mL de canamicina para o plasmídeo que contém o gene da *luciferase* (módulo de resposta). As placas foram incubadas *overnight* em estufa a 37 °C para o crescimento de colônias isoladas e posterior passagem para meio líquido.

Em seguida, após o crescimento das colônias, pré-inóculos foram incubados em agitador *shaker* por 16h, nas mesmas condições anteriormente descritas, e adicionados à cultura de 500 mL a fim de produzir plasmídeos em escala maior. A extração e purificação do DNA foi realizada a partir do kit *Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo as indicações e especificações do fabricante.

Para verificar a clonagem correta dos plasmídeos foram realizadas digestões com enzimas de restrição. O módulo de resposta já havia sido confirmado pelo grupo anteriormente, mas para os módulos de detecção foram utilizadas as enzimas *Sall* e *XbaI*. O kit utilizado foi o da *New England Biolabs (NEB) Restriction Enzymes*, seguindo as indicações e especificações do fabricante. As digestões foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) para análise dos plasmídeos e a 2% (m/v) para os RNAs *trigger*, utilizando tampão TAE 1× e TBE 0,5×, respectivamente.

3.4 Reações livres de células e leitura da luminescência

As reações livres de células foram realizadas utilizando o kit *T7 S30 Extract System for Circular DNA* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, com adaptações descritas a seguir: As reações foram preparadas com volume final de 10 µL, incubadas a 30 °C por 3 horas e interrompidas pela adição de albumina sérica bovina (BSA) a 1%, na proporção de 1:10 (v/v). Para análise da luminescência da luciferase 10 µL da reação interrompida foram misturados a 50 µL do reagente contendo o substrato da luciferase, *Luciferase Assay System* (Promega), em microplaca de 96 poços branca e opaca. As leituras foram realizadas conforme o

protocolo de luminescência específico para luciferase no leitor de microplacas multimodal *SpectraMax iD3*.

3.5 Condições experimentais dos ensaios de triagem, refinamento e prova de conceito

Os ensaios de triagem dos *toehold switches* para os genes H5 e N1 foram realizados em reações livres de células realizadas com diferentes concentrações dos módulos de detecção e resposta (incluindo os *switches* H5-a,b,c e N1-e,d,f), seguindo o protocolo geral descrito no item 3.4. Para cada construção, foram testadas concentrações de RNA sintético variando de 0 a 2000 nM, em única réplica biológica e técnica, o sinal de luminescência foi registrado após 3 h de incubação a 30 °C. As curvas resultantes foram utilizadas para comparar qualitativamente o desempenho relativo dos candidatos a fim de selecioná-los para etapas posteriores. Para essa triagem inicial, os módulos de detecção e resposta foram testados nas seguintes combinações de DNA plasmidial: 25 ng totais na proporção 1:5 e 2:5 (H5-a,b), 12 ng na proporção 2:1 (H5-c) e 16 ng nas proporções 2:1, 1:2 e 1:5 (N1-d, N1-e e N1-f, respectivamente), apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Condições experimentais da triagem inicial dos *switches* H5 e N1. Triagem inicial dos *toehold switches* direcionados aos genes H5 e N1 conduzida em sistema de expressão livre de células. As reações foram realizadas com diferentes combinações dos módulos de detecção e resposta, variando-se a quantidade total de DNA plasmidial e a proporção entre os módulos (detecção:resposta). Para cada construção, foram avaliadas concentrações de RNA sintético variando de 0 a 2000 nM. As reações foram incubadas por 3 horas a 30 °C, e a luminescência foi mensurada conforme protocolo descrito no item 3.4. Cada condição experimental foi realizada em uma única réplica biológica e em única réplica técnica.

Construção	DNA total (ng)	Proporção detecção:resposta	RNA sintético (nM)	Incubação
H5-a	25	1:5	0-2000	3 h a 30 °C
H5-b	25	2:5	0-2000	3 h a 30 °C
H5-c	12	2:1	0-2000	3 h a 30 °C
N1-d	16	2:1	0-2000	3 h a 30 °C
N1-e	16	1:2	0-2000	3 h a 30 °C
N1-f	16	1:5	0-2000	3 h a 30 °C

Na etapa de refinamento, focada nas construções selecionadas na triagem (H5-b e N1-f), foram avaliadas diferentes combinações de quantidade total de DNA plasmidial por reação e proporção entre os módulos de detecção e de resposta. Para o *switch* H5-b, testaram-se condições como 30 ng de DNA total em proporções 2:5, além de combinações como 60 ng e 72 ng (1:3). Para o *switch* N1-f, foram exploradas condições com 16 ng e 32 ng de DNA total, em proporções como 1:5 e 2:1 entre os módulos, ilustrados na Tabela 2. Nesses ensaios piloto (n = 1), a resposta do sistema foi medida em 0 e 20 nM de RNA sintético, mantendo-se constantes o volume final das reações livre de células, o tempo de incubação (3 h a 30 °C) e o protocolo de leitura descrito em 3.4.

Tabela 2. Condições testadas no refinamento dos *switches* H5-b e N1-f selecionados após triagem inicial. Foram testadas diferentes quantidades totais de DNA plasmidial por reação e proporções entre os módulos de detecção e resposta. A resposta do sistema foi analisada nas concentrações de 0 e 20 nM de RNA sintético a fim de selecionar a melhor proporção entre os módulos. As reações foram incubadas por 3 horas a 30 °C, mantendo-se constantes os demais parâmetros experimentais. O experimento foi conduzido em uma única réplica biológica e em única réplica técnica.

Construção	DNA total (ng)	Proporção detecção:resposta	RNA sintético (nM)	Incubação
H5-b	30	2:5	0-20	3 h a 30 °C
H5-b	60	1:3	0-20	3 h a 30 °C
H5-b	72	1:3	0-20	3 h a 30 °C
N1-f	16	1:5	0-20	3 h a 30 °C
N1-f	16	2:1	0-20	3 h a 30 °C
N1-f	32	2:1	0-20	3 h a 30 °C

A partir das condições experimentais previamente estabelecidas após os ensaios de triagem e refinamento (Tabela 3), foram conduzidos ensaios independentes de prova de conceito para os *switches* H5-b e N1-f em sistema de expressão livre de células. As reações foram montadas utilizando-se as quantidades totais de DNA plasmidial e proporções entre os módulos de detecção e resposta previamente definidas, correspondendo a 45,5 ng de DNA total na proporção 1:3 (detecção:resposta) para o *switch* H5-b e 33 ng de DNA total na proporção 2:1 para o *switch* N1-f.

Tabela 3. Condições finais definidas para os *switches* selecionados após os ensaios de triagem e refinamento. Especificação dos *toehold switches* selecionados (H5-b e N1-f), incluindo a quantidade total de DNA plasmidial empregada nas reações em sistema de expressão livre de células e a proporção final entre os módulos de detecção e resposta (detecção:resposta). As condições apresentadas foram estabelecidas com base no desempenho observado a partir dos ensaios de otimização.

Construção	DNA total (ng)	Proporção detecção:resposta
H5-b	45,5	1:3
N1-f	33 ng	2:1

Para cada *switch*, foram realizados três ensaios independentes, considerados como réplicas biológicas (R1, R2 e R3). Em cada ensaio, as reações foram incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente para o sistema *cell-free*, na presença de RNA sintético correspondente ao alvo, em concentrações variando de 0 a 2000 nM (Tabela 4). Após incubação, a luminescência foi mensurada conforme o protocolo previamente descrito no item 3.4, sendo os valores obtidos utilizados para a construção das curvas de resposta de cada réplica biológica.

Tabela 4. Condições experimentais dos ensaios de prova de conceito dos *switches* H5-b e N1-f. Condições experimentais adotadas nos ensaios de prova de conceito conduzidos em sistema de expressão livre de células, após definição das melhores combinações de DNA plasmidial nos experimentos de triagem e refinamento. Para cada construção, foram realizados três ensaios independentes (R1, R2 e R3), avaliando-se concentrações de RNA sintético na faixa de 0 a 2000 nM. As reações foram incubadas por 3 horas a 30 °C e a luminescência foi mensurada conforme protocolo descrito no item 3.4.

Construção	DNA total (ng)	Proporção detecção:resposta	RNA sintético (nM)	Incubação	Réplicas Biológicas
H5-b	45,5	1:3	0-2000	3 h a 30 °C	3 (R1, R2, R3)
N1-f	33	2:1	0-2000	3 h a 30 °C	3 (R1, R2, R3)

Ao identificar problemas de reprodutibilidade e da suspeita de contaminação ou degradação dos reagentes, foram realizadas novas etapas de transformação e clonagem com o objetivo de obter novos estoques de DNA plasmidial. Os plasmídeos obtidos foram purificados e, subsequentemente, submetidos a uma etapa adicional de precipitação com etanol absoluto, visando aumentar a pureza e a estabilidade do material genético. Em seguida, os plasmídeos purificados foram aliquotados em volumes de 20 µL, assim como os componentes do sistema *cell-free*,

e armazenados em *freezer* dedicado, sendo destinados a uso único nas reações de detecção das sequências-alvo.

3.6 Ensaios com o *switch* N1-f após padronização do protocolo e uso de inibidor de RNase

Após a adoção de mudanças no preparo e manuseio dos reagentes, foi realizado um novo ensaio exploratório com o *switch* N1-f para reavaliar o desempenho do biossensor sob condições mais controladas. Nesse experimento, foram testadas diferentes combinações de quantidade total de DNA plasmidial e proporção entre o módulo de detecção e o módulo de resposta, de forma análoga ao refinamento descrito em 3.5, avaliando-se a resposta do sistema em 0 e 20 nM de RNA sintético (Tabela 5). O volume final das reações, o tempo de incubação (3 h a 30 °C) e o protocolo de leitura de luminescência foram os mesmos descritos em 3.4.

Tabela 5. Avaliação do efeito da concentração total de DNA plasmidial e da proporção entre módulos de detecção e resposta sob novo protocolo. Ensaio conduzido em sistema de expressão livre de células com variação da quantidade total de DNA plasmidial por reação (20-120 ng) e da proporção entre os módulos de detecção e resposta (1:1, 1:5 e 2:5). Foram testadas quatro combinações experimentais, com mensuração da luminescência na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo. As reações foram incubadas por 3 horas a 30 °C, conforme protocolo descrito no item 3.4.

Condição	DNA total (ng)	Proporção detecção:resposta	RNA sintético (nM)	Incubação
C1	60	1:5	0-20	3 h a 30 °C
C2	20	1:1	0-20	3 h a 30 °C
C3	70	2:5	0-20	3 h a 30 °C
C4	120	1:5	0-20	3 h a 30 °C

Em seguida, foi realizado um ensaio pontual utilizando 33 ng totais, (proporção 2:1) do *switch* N1-f, no qual a resposta do sistema foi medida em 0 e 20 nM de RNA sintético, com o objetivo de verificar a estabilidade do controle sem RNA (0 nM) e a capacidade de resposta em 20 nM sob novo protocolo. Posteriormente, foi conduzida uma tentativa de réplica biológica desse ensaio nas mesmas condições, mantendo-se o mesmo protocolo de preparo, incubação e leitura, a fim de avaliar a reprodutibilidade da resposta observada (Tabela 6).

Tabela 6. Condições experimentais dos ensaios com o *switch* N1-f após padronização do protocolo. As reações foram realizadas com 33 ng de DNA plasmidial total na proporção 2:1 entre os módulos de detecção e resposta, avaliando-se a resposta do sistema na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo. As reações foram incubadas por 3 horas a 30 °C e a luminescência foi mensurada conforme descrito no item 3.4. As condições foram reproduzidas em dois ensaios independentes, conduzidos com o objetivo de avaliar a estabilidade do controle negativo e a reprodutibilidade da resposta observada.

Construção	DNA total (ng)	Proporção detecção:resposta	RNA sintético (nM)	Incubação
N1-f	33	2:1	0-2000	3 h a 30 °C

Por fim, foi realizado um ensaio adicional com o *switch* N1-f, desta vez com a adição de inibidor de RNase no momento do preparo do experimento (Tabela 7). As reações foram incubadas por 3 horas a 30 °C e a luminescência analisada conforme o protocolo descrito em 3.4.

Tabela 7. Condições experimentais do ensaio adicional com o *switch* N1-f incluindo a adição de inibidor de RNase. As reações foram realizadas com 33 ng de DNA total na proporção 2:1 entre os módulos de detecção e resposta, sendo avaliadas as respostas em 0 e 20 nM de RNA sintético alvo. As reações foram incubadas por 3 horas a 30 °C e a luminescência da luciferase foi determinada conforme protocolo descrito no item 3.4. O experimento foi conduzido com o objetivo de investigar a possível influência da degradação de RNA na resposta do sistema.

Construção	DNA total (ng)	Proporção detecção:resposta	RNA sintético (nM)	Incubação	Inibidor de RNase
N1-f	33	2:1	0-2000	3 h a 30 °C	sim

3.7 Predição estrutural e análise termodinâmica *in silico*

A estabilidade estrutural dos *toehold switches* e sua interação com os RNAs alvo foram avaliadas por meio de predições termodinâmicas utilizando os servidores *RNAfold WebServer* e *RNAcofold WebServer*, ferramentas pertencentes ao pacote *ViennaRNA* (Gruber *et al.*, 2008; Lorenz *et al.*, 2011).

Inicialmente, a estrutura secundária dos *toeholds* isolados foi predita utilizando o *RNAfold WebServer* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>), a fim de avaliar a conformação estrutural dos sensores na ausência do RNA alvo. Para cada sequência, foram obtidas a estrutura secundária de menor energia, a energia livre

associada (ΔG) e a energia livre do *ensemble*, permitindo avaliar a estabilidade estrutural intrínseca dos *toeholds*.

Em seguida, a interação entre cada *toehold* e seu respectivo RNA alvo (H5 ou N1) foi analisada utilizando o *RNAcofold WebServer* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAcofold.cgi>). Para cada par, foram obtidas a estrutura secundária ótima do heterodímero, a energia livre mínima do complexo (MFE), a energia livre do conjunto termodinâmico e a frequência da estrutura MFE dentro do *ensemble*.

O potencial de interação entre sensor e alvo foi avaliado com base no ΔG de ligação do heterodímero, calculado como a diferença entre a energia do complexo e as energias dos monômeros individuais. Valores mais negativos de ΔG de ligação foram interpretados como indicativos de maior afinidade e maior favorecimento termodinâmico da hibridização.

3.8 Análise estatística

Devido ao caráter exploratório e à limitação no número de réplicas biológicas em diversas etapas do estudo, não foram realizados testes estatísticos inferenciais formais. Os dados foram analisados de forma descritiva, por meio da comparação visual de curvas e dos valores de luminescência entre as diferentes condições experimentais, buscando identificar tendências gerais de resposta dos biossensores em função das concentrações de DNA e RNA.

Os gráficos e esquemas foram elaborados utilizando os *softwares*: *Google Sheets*, *BioRender* e *Adobe Photoshop*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção dos alvos e desenho dos sensores

Durante o alinhamento das sequências H5 e N1, foi observado que a identificação de trechos extensos com elevada conservação apresentava desafios, refletindo a alta taxa de mutação e a capacidade de recombinação dos vírus influenza. Mesmo aplicando um critério de seleção relativamente restritivo (regiões com cerca de 78% de correspondência), foram raros os segmentos suficientemente

longos e homogêneos para o desenho de alvos do tipo *toehold*. Esse obstáculo é coerente com os achados de Palma (2025), que, ao analisar sequências de H5N1, não identificou trechos contínuos de resíduos idênticos, relatando apenas conservação pontual de alguns aminoácidos. No caso deste estudo, além da necessidade de encontrar regiões suficientemente conservadas, houve a restrição adicional de selecionar alvos que permitissem a construção de *toehold switches* robustos e funcionais, ou seja, sequências que não introduzissem códons de parada prematuros no *frame* de leitura do gene repórter e não gerassem proteínas truncadas; essa combinação de elevada variabilidade genômica e exigências estruturais do biossensor restringiu ainda mais o conjunto de regiões candidatas, explicando a dificuldade observada na seleção de alvos ideais.

Considerando a elevada taxa de mutação característica de vírus de RNA, a adoção de um critério de similaridade mais permissivo permite acomodar a diversidade genética natural das cepas circulantes. Dessa forma, o limiar de 78% de similaridade possibilita a detecção de variantes geneticamente relacionadas, reduzindo o risco de falsos-negativos decorrentes de mutações pontuais ou do acúmulo de substituições ao longo do tempo. Essa abordagem é corroborada pelos achados de McSweeney *et al.* (2023), que demonstraram que *toehold switches* de RNA apresentam elevada robustez a múltiplas incompatibilidades de nucleotídeos na região de ancoragem, mantendo ativação significativa mesmo na presença de até sete mutações nesta região. Em contrapartida, os autores observaram alta sensibilidade a mutações localizadas na região da haste (*stem*), a qual foi consistentemente identificada como a principal determinante da especificidade do *toehold switch*. Assim, a adoção de um critério de similaridade de 78% é compatível com o funcionamento estrutural desses sistemas, desde que as regiões críticas para a formação da estrutura secundária do *toehold switch* sejam preservadas, permitindo simultaneamente robustez frente à variabilidade genética e especificidade adequada para aplicações diagnósticas.

4.2 Validação dos plasmídeos e síntese dos RNAs

Para a verificação e validação dos plasmídeos sintetizados realizou-se uma digestão enzimática utilizando *Sall* e *XbaI*, o que resultou na liberação de um

fragmento de aproximadamente 118 pb, visualizado em gel de agarose (Figura 9a). Paralelamente, os RNAs sintéticos transcritos *in vitro* correspondentes às glicoproteínas H5 e N1 foram analisados em gel juntamente com os oligonucleotídeos anelados, sendo identificados como 1 e 3, respectivamente (Figura 9b).

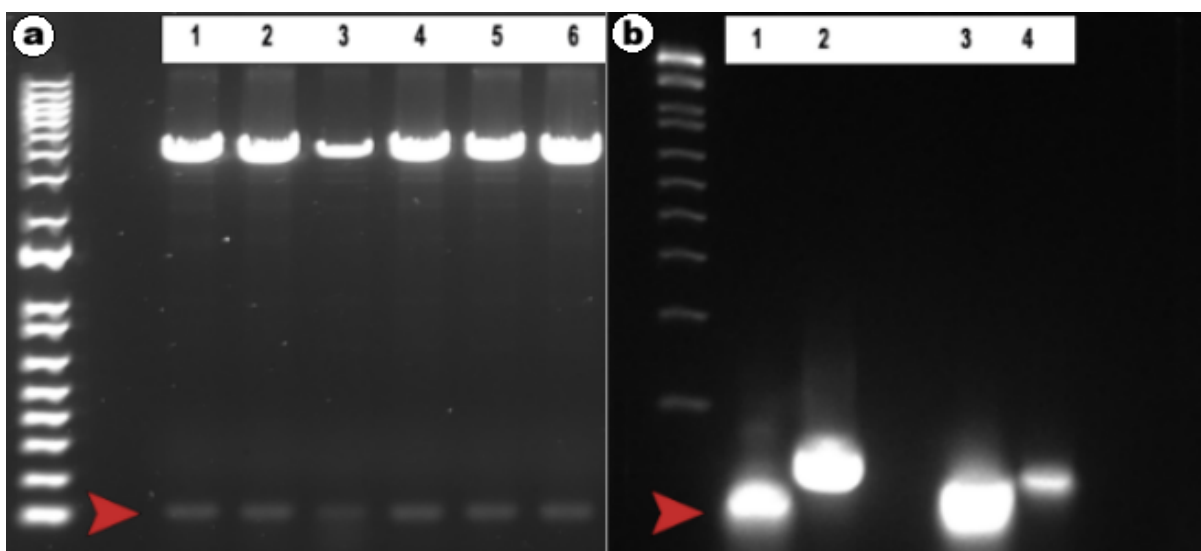


Figura 9. Validação dos plasmídeos e dos moldes de transcrição dos RNAs *trigger*. (a) Análise por digestão enzimática dos plasmídeos contendo os *switches* H5 (poços 1-3) e N1 (poços 4-6), evidenciando os fragmentos com os tamanhos esperados. (b) RNAs *trigger* obtidos por transcrição *in vitro* a partir de fragmentos de dsDNA gerados por anelamento de oligonucleotídeos. Cada RNA *trigger* é apresentado ao lado de seu respectivo dsDNA molde. Os RNAs H5 e N1 estão nos poços 1 e 3, respectivamente.

As ilustrações referentes à construção de cada plasmídeo utilizado para a estratégia deste trabalho estão dispostas no apêndice A, bem como as sequências exatas dos plasmídeos. A validação por digestão enzimática, associada à visualização dos RNAs sintéticos em gel, assegurou que tanto os plasmídeos quanto os *trigger* de RNA apresentavam o tamanho esperado; condição indispensável para que as etapas subsequentes de triagem e prova de conceito refletissem, de fato, o comportamento dos *switches* desenhados.

4.3 Triagem dos sensores em reação livre de células

Ensaio exploratórios iniciais foram realizados com diferentes *switches* desenhados para os genes H5 e N1, com o objetivo de selecionar faixas de concentração e candidatos mais promissores. Nessa triagem foi conduzida apenas

uma réplica biológica, com leitura única por condição; assim, os dados foram utilizados de forma descritiva, sem análise estatística inferencial. Os perfis de resposta em função da concentração de RNA (0-2000 nM) foram representados em gráficos de linhas, após correção da luminescência de cada ponto pelo controle negativo sem RNA (0 nM), o que facilitou a visualização do sinal específico. Os dados brutos correspondentes aos experimentos a seguir encontram-se nas Tabelas B1-11 do Apêndice B. Valores negativos resultantes dessa correção indicam condições em que o sinal ficou abaixo do controle negativo, os quais foram identificados no apêndice como ajustes. Os *switches* com melhor desempenho foram destacados com linhas mais espessas apenas para facilitar a visualização; todos os valores referem-se aos dados experimentais obtidos.

Dentre os seis *switches* projetados, o *switch* H5-b (Figura 10) apresentou maior sinal de luminescência e comportamento dose-resposta mais consistente em relação aos demais candidatos, enquanto, para o *switch* N1-f (Figura 11) mostrou desempenho superior nas condições testadas. Esses dois *switches* foram, então, selecionados para a etapa seguinte de refinamento e prova de conceito.

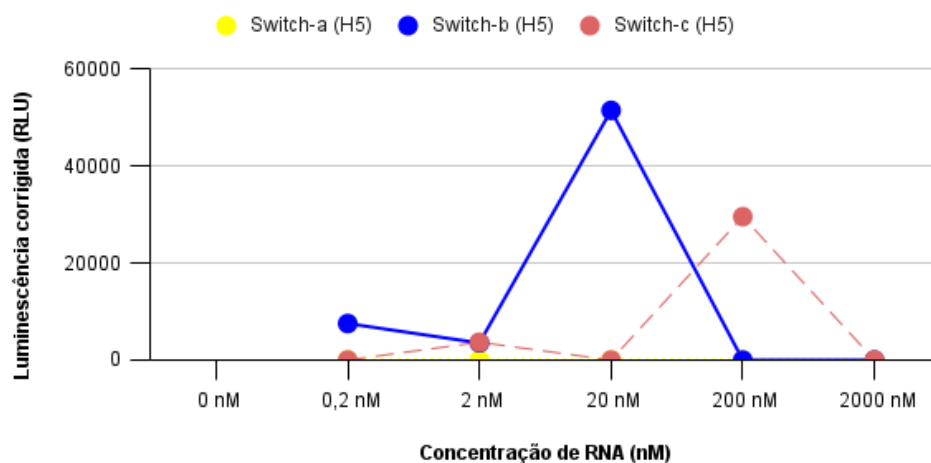


Figura 10. Triagem dos *switches* para detecção do gene H5. Curvas de luminescência (RLU) corrigidas pelo controle (0 nM de RNA), em função da concentração de RNA sintético (0-2000 nM), para os diferentes *switches* avaliados. Para H5-a e H5-b, foram utilizados 25 ng de DNA plasmidial total nas proporções 1:5 e 2:5 (detecção:resposta), respectivamente. Para H5-c, foram utilizados 12 ng na proporção 2:1. As reações foram conduzidas em sistema de expressão livre de células, com incubação por 3 h a 30 °C. Dados referentes a um ensaio biológico, com uma repetição técnica.

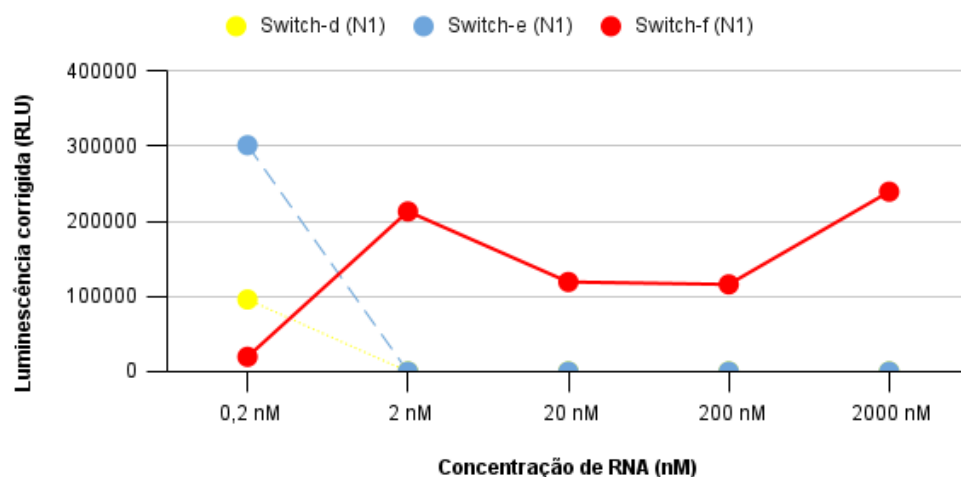


Figura 11. Triagem dos *switches* para detecção do gene N1. Curvas de luminescência (RLU) corrigidas pelo controle (0 nM de RNA), em função da concentração de RNA sintético (0-2000 nM), para os diferentes *switches* avaliados. Para N1-d, N1-e e N1-f, foram utilizados 16 ng de DNA plasmidial total nas proporções 2:1, 1:2 e 1:5, respectivamente. As reações foram conduzidas em sistema de expressão livre de células, com incubação por 3 h a 30 °C. Dados referentes a um ensaio biológico, com uma repetição técnica.

Abordagens semelhantes de triagem inicial, baseadas na avaliação comparativa de múltiplos *switches* para a seleção de candidatos com melhor relação sinal/ruído, também foram empregadas no desenvolvimento de biossensores do tipo *toehold* para a detecção do vírus West Nile. Esses estudos reforçam a importância da etapa exploratória como parte fundamental do processo de seleção de sensores funcionais (Giakountis *et al.*, 2023).

4.4 Refinamento das condições de DNA (H5-b e N1-f)

Em um segundo momento, foi realizado um ensaio de refinamento das condições de reação para o *switch* H5-b, variando simultaneamente a quantidade total de DNA plasmidial e a proporção entre os módulos de detecção e de resposta. Nesse experimento piloto ($n = 1$), avaliou-se a resposta do sistema em 0 e 20 nM de RNA sintético (Figura 12). Foi observado que a condição com 60 ng de DNA total na proporção 1:3 resultou maior aumento de sinal entre 0 e 20 nM, enquanto outras combinações apresentaram resposta menos pronunciada ou sinal de fundo mais elevado. Esses resultados foram utilizados como guia para a escolha de condições a serem priorizadas, sem configurar uma análise quantitativa definitiva.

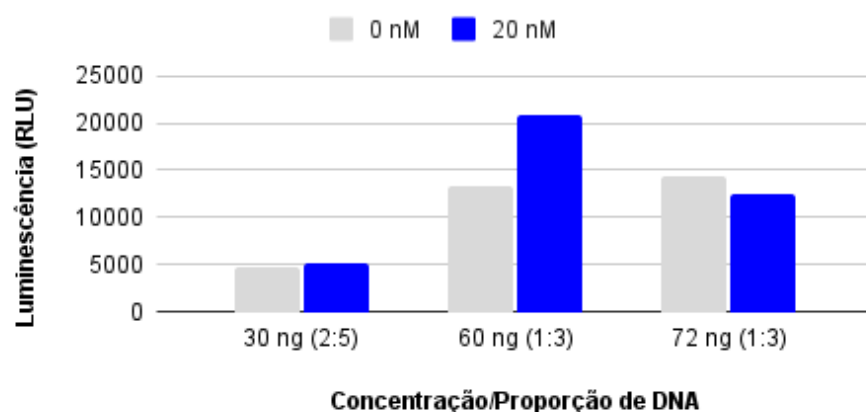


Figura 12. Refinamento da proporção entre os módulos de detecção e resposta para o *switch* H5-b. Luminescência (RLU) obtida na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA *trigger* H5, avaliando diferentes quantidades totais de DNA plasmidial e proporções entre os módulos de detecção e resposta (30 ng na proporção 2:5; 60 ng na proporção 1:3; 72 ng na proporção 1:3). Dados referentes a um ensaio biológico, com uma repetição técnica por condição.

Similarmente, foi realizado um ensaio de refinamento das condições do *switch* N1-f, no qual foram avaliadas diferentes quantidades totais de DNA e proporções entre os módulos de detecção e resposta (Figura 13). Embora a condição contendo 16 ng de DNA na proporção 1:5 tenha apresentado maior intensidade de sinal na presença de 20 nM de RNA, a proporção 2:1 foi selecionada para os ensaios subsequentes, por apresentar menor sinal de fundo na condição controle (0 nM). A comparação com diferentes combinações, incluindo a proporção 2:1 com 16 ng de plasmídeo total, evidenciou que o nível de DNA empregado influencia diretamente a magnitude da resposta do sistema, reforçando o caráter exploratório dessa etapa de padronização. As concentrações e proporções finais selecionadas para cada *switch* encontram-se descritas na Tabela 3, após a realização de ajustes finos voltados à obtenção da melhor resposta analítica.

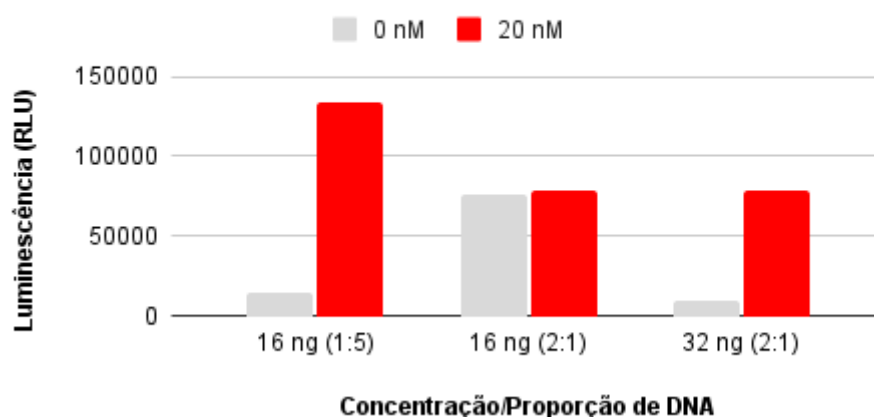


Figura 13. Refinamento da proporção entre os módulos de detecção e resposta para o *switch* N1-f. Luminescência (RLU) obtida na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo, avaliando diferentes quantidades totais de DNA plasmidial e proporções entre os módulos de detecção e resposta (16 ng nas proporções 1:5 e 2:1; 32 ng na proporção 2:1). Dados referentes a um ensaio biológico, com uma repetição técnica por condição.

Considerando a arquitetura modular do sistema desenvolvido, composta por dois plasmídeos, torna-se fundamental a realização de uma análise minuciosa do equilíbrio entre as concentrações plasmidiais empregadas. Estudos demonstram que, em sistemas de expressão gênica livre de células, a simples presença de múltiplos plasmídeos pode resultar em interações não específicas, capazes de alterar significativamente os níveis de RNA e proteína produzidos, independentemente da função regulatória pretendida (Piorino *et al.*, 2023).

De acordo com os autores, variações na concentração relativa de plasmídeos podem induzir tanto efeitos de interferência positiva quanto negativa, decorrentes de mecanismos como distração de ribonucleases, competição por RNA polimerases e ribossomos, assim como aceleração do esgotamento energético do sistema. Esses efeitos tornam-se particularmente relevantes em circuitos modulares, nos quais a ativação do módulo de resposta depende diretamente da eficiência da tradução imposta pelo módulo de detecção. Assim, concentrações excessivas do módulo de detecção podem resultar em uma produção desproporcional de transcritos e proteínas intermediárias, comprometendo a disponibilidade de recursos necessários para a expressão eficiente do gene repórter no módulo de resposta.

Nesse contexto, o balanceamento intencional das concentrações plasmidiais emerge como um critério de projeto essencial para a preservação da especificidade

e da faixa dinâmica do sistema. Conforme demonstrado por Piorino *et al.* (2023), ajustes cuidadosos nas quantidades de cada DNA permitem mitigar efeitos artefatuais associados à interação entre plasmídeos, reduzindo o risco de falsos-positivos e interpretações equivocadas da atividade funcional do circuito. Portanto, a definição das proporções entre os módulos constitui um elemento central para garantir a funcionalidade de biossensores baseados em sistemas acelulares.

4.5 Prova de conceito e problemas de reprodutibilidade

A partir dessas condições selecionadas, foram realizados três ensaios independentes, caracterizados como prova de conceito para os *switches* H5-b e N1-f, na faixa de 0-2000 nM de RNA sintético. As curvas obtidas para cada réplica biológica (R1, R2 e R3) mostraram respostas pouco reprodutíveis, com perda progressiva de sinal em concentrações mais altas e variação acentuada no comportamento do sistema (Figuras 14 e 15).

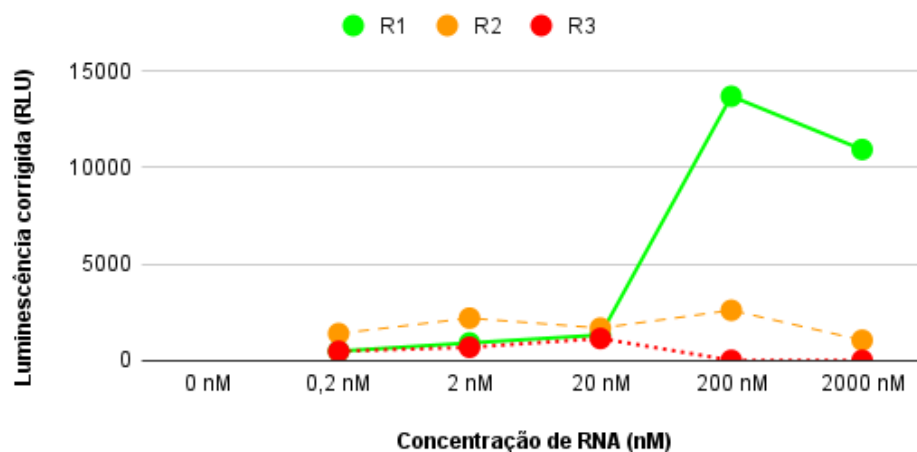


Figura 14. Curvas de resposta dos *switch* H5-b. Luminescência (RLU) obtida na ausência (0 nM) e na presença de concentrações crescentes de RNA sintético alvo (0,2-2000 nM), utilizou-se 45,5 ng de DNA plasmidial total e proporção 1:3 entre os módulos de detecção e resposta. Foram realizados três ensaios biológicos independentes (R1-R3). Os valores apresentados correspondem à luminescência corrigida pela subtração do sinal médio do controle negativo (0 nM) de cada ensaio.

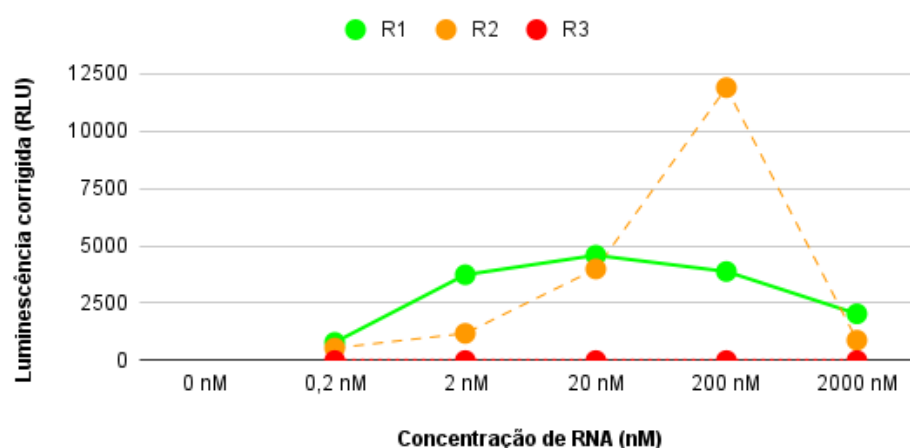


Figura 15. Curvas de resposta do *switch* N1-f. Luminescência (RLU) obtida na ausência (0 nM) e na presença de concentrações crescentes de RNA sintético alvo (0,2-2000 nM), utilizou-se 33 ng de DNA plasmidial total e proporção 2:1 entre os módulos de detecção e resposta. Foram realizados três ensaios biológicos independentes (R1-R3). Os valores apresentados correspondem à luminescência corrigida pela subtração do sinal médio do controle negativo (0 nM) de cada ensaio.

Além disso, observou-se um aumento sistemático do sinal no controle sem RNA (0 nM) ao longo das três réplicas (Figura 16), indicando crescimento anormal do ruído de fundo. Esse conjunto de achados é incompatível com um biossensor estável e levou à suspeita de contaminação ou degradação de reagentes. A partir desse diagnóstico, os dados dessa fase passaram a ser considerados apenas de forma descritiva, e o foco experimental foi redirecionado para testes pontuais com o *switch* N1-f, empregando o novo protocolo de preparo e manuseio dos reagentes.

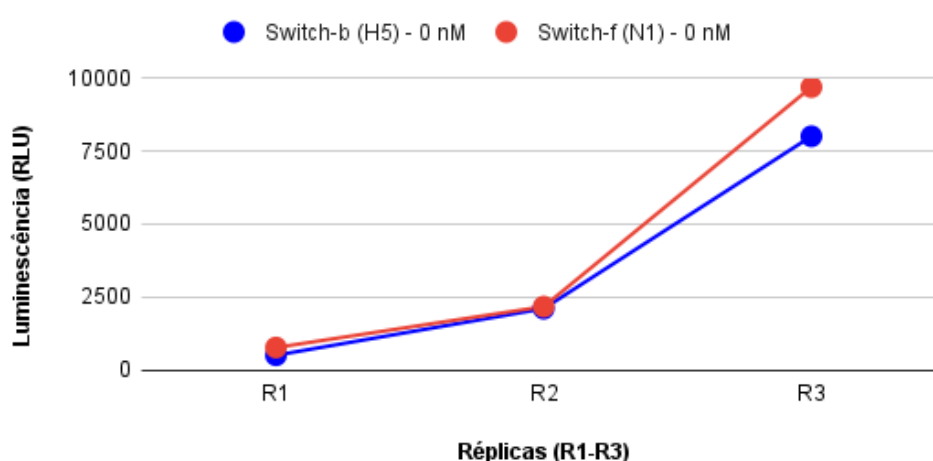


Figura 16. Variação do sinal de fundo (0 nM de RNA) dos *switches* H5-b e N1-f ao longo das réplicas biológicas. Luminescência (RLU) obtida na ausência de RNA sintético alvo (0 nM) em três ensaios biológicos independentes (R1-R3). Para o *switch* H5-b (azul), foram utilizados 45,5 ng de DNA plasmidial total na proporção 1:3 entre os módulos de detecção e resposta; para o *switch* N1-f (vermelho), 33 ng de DNA total na proporção 2:1. Cada ponto representa a média das réplicas técnicas dentro de cada ensaio biológico.

Em conjunto, esses resultados indicam que, nas condições inicialmente testadas, o sistema ainda não apresentava robustez suficiente para uso como ensaio diagnóstico, uma vez que variações sutis na manipulação dos reagentes impactaram tanto o sinal específico quanto o ruído de fundo. Esse comportamento é compatível com a natureza sensível de sistemas baseados em RNA em reações livres de células, nos quais pequenas contaminações ou degradação parcial de componentes podem comprometer significativamente a reprodutibilidade. Nesse contexto, Boyd *et al.* (2023) investigaram o uso de vesículas como estratégia para proteger biossensores baseados em RNA em reações de expressão livre de células. Os autores demonstraram que esses sistemas são altamente suscetíveis à ação de RNases, posto que a coencapsulação da endonuclease com o sensor levou à completa extinção da atividade ribossomal, resultando na perda de sinal associada à degradação dos componentes do *riboswitch*. Por outro lado, quando os sensores acelulares foram encapsulados exclusivamente com o analito de interesse, sua integridade foi preservada, evidenciando a robustez das vesículas, capazes de proteger o sensor da degradação e, simultaneamente, permitir a ativação do sistema. Esses achados fornecem uma base conceitual para interpretar as limitações observadas neste estudo e apontam para estratégias promissoras de proteção molecular, ampliando o potencial de aplicação de biossensores baseados em RNA em ambientes com elevada carga de contaminantes e condições adversas.

A estabilização do controle negativo foi confirmada ao utilizar alíquotas únicas de DNA, mantendo o sinal da amostra sem RNA (0 nM) consistentemente baixo em todas as combinações testadas dos módulos totais e suas proporções (Figura 17). Com o objetivo de verificar se as concentrações inicialmente otimizadas correspondiam a valores subótimos, novas condições experimentais foram avaliadas. No entanto, não se observou melhora significativa no desempenho, indicando que a resposta ao RNA sintético (20 nM) permaneceu dependente dos parâmetros de DNA já estabelecidos. Esse comportamento é consistente com os achados de Piorino *et al.* (2023), que demonstraram que concentrações elevadas de plasmídeo repórter (>30 nM) podem levar à saturação e ao acúmulo de subprodutos tóxicos, resultando na interrupção precoce da expressão e na alteração da dinâmica do sinal.

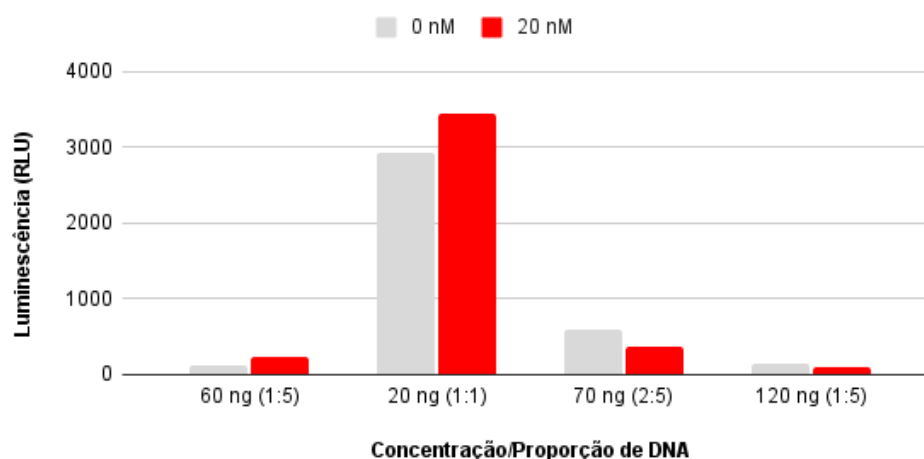


Figura 17. Avaliação pontual do *switch* N1-f em diferentes concentrações totais e proporções entre os módulos de detecção e resposta. Luminescência (RLU) obtida na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo, utilizando diferentes quantidades totais de DNA plasmidial e proporções entre os módulos de detecção e resposta: 60 ng (1:5), 20 ng (1:1), 70 ng (2:5) e 120 ng (1:5). As barras representam a média das três réplicas técnicas por condição. Dados referentes a um ensaio biológico independente.

Dessa forma, os testes foram mantidos nas condições previamente otimizadas para o *switch* N1-f (33 ng de DNA total, proporção 2:1). A implementação do novo protocolo de preparo dos reagentes resultou em um ensaio pontual com baixo sinal basal na ausência de RNA (0 nM) e elevada resposta luminescente na presença de 20 nM de RNA sintético (Figura 18), com o *switch* N1-f exibindo intensidade 22 vezes superior ao controle negativo. Esse resultado evidencia o funcionamento adequado do sistema quando utilizadas exclusivamente alíquotas de DNA purificado, destacando que a qualidade e padronização dos reagentes são críticas para a reprodutibilidade em sistemas *cell-free* baseados em RNA. Os valores correspondem às médias das réplicas técnicas, sem correção, uma vez que o objetivo deste ensaio foi verificar especificamente a estabilidade do controle (0 nM) e a capacidade de resposta em 20 nM sob o novo protocolo.

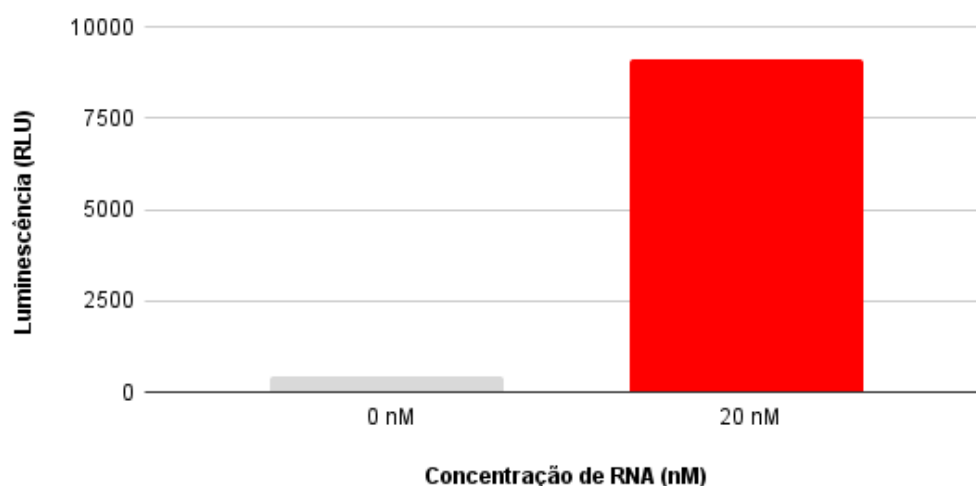


Figura 18. Avaliação da luminescência do *switch* N1-f sob novo protocolo e condições previamente otimizadas de DNA. Luminescência (RLU) obtida na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo, utilizando 33 ng de DNA plasmidial total na proporção 2:1 entre os módulos de detecção e resposta. As barras representam a média das três réplicas técnicas por condição. Dados referentes a um ensaio biológico independente.

4.6 Efeito de RNase e recuperação do sinal com inibidor

Em uma tentativa de réplica sob as mesmas condições, não foi observada diferença entre as concentrações de 0 e 20 nM, sugerindo possível degradação do RNA por RNases (Figura 19).

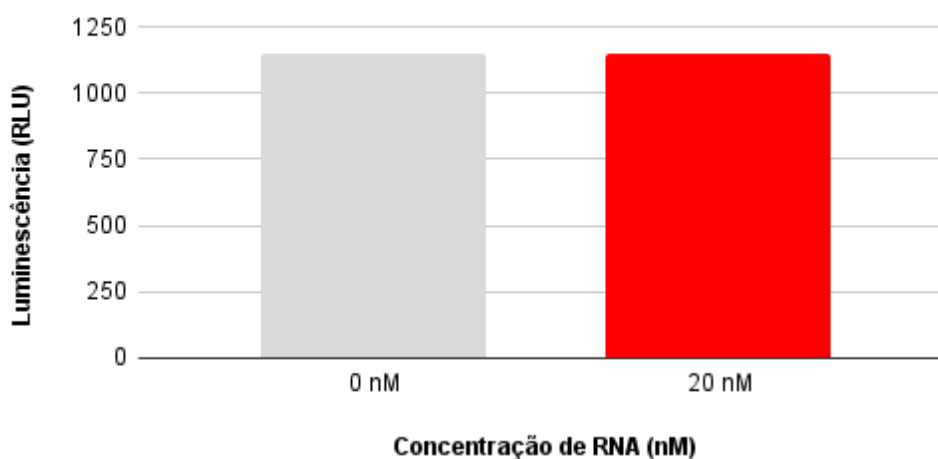


Figura 19. Tentativa de réplica do ensaio do *switch* N1-f sob as condições otimizadas de DNA. Luminescência (RLU) obtida na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo, utilizando 33 ng de DNA plasmidial total na proporção 2:1 entre os módulos de detecção e resposta, sob o novo protocolo experimental. As barras representam a média das três réplicas técnicas por condição. Dados referentes a um ensaio biológico independente conduzido como tentativa de reprodução das condições previamente estabelecidas.

No ensaio subsequente, a adição de inibidor de RNase resultou na recuperação da resposta em 20 nM em mais de 4 vezes, com manutenção de baixo sinal em 0 nM (Figura 20), reforçando a ideia de que a perda de sinal estava associada à ação de RNases, e não à instabilidade intrínseca do *switch*.

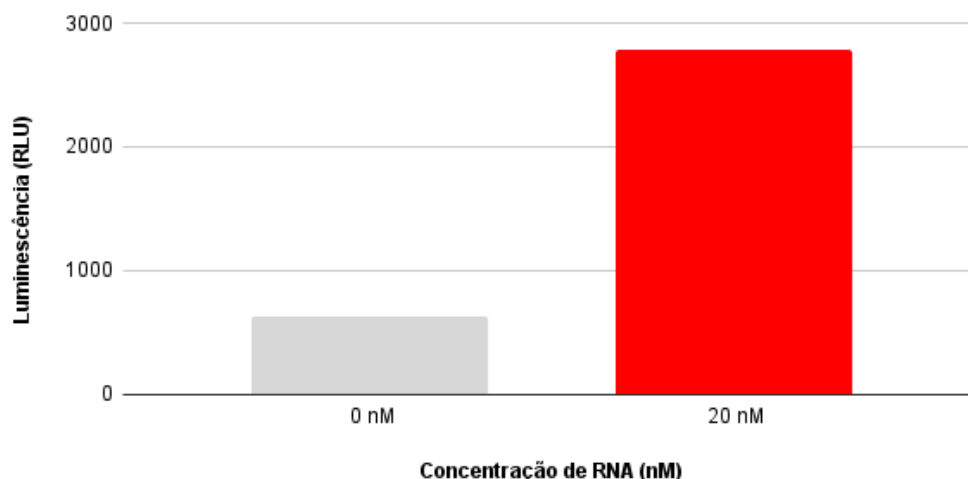


Figura 20. Ensaio pontual do *switch* N1-f com adição de inibidor de RNase. Luminescência (RLU) obtida na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo, utilizando 33 ng de DNA plasmidial total na proporção 2:1 entre os módulos de detecção e resposta, sob o novo protocolo experimental com adição de inibidor de RNase. As barras representam a média das três réplicas técnicas por condição. Dados referentes a um ensaio biológico independente.

Esse padrão de perda e posterior recuperação de sinal após a adição de inibidor de RNase é coerente com o papel central da degradação de RNA na performance de dispositivos baseados em RNA. Revisões recentes destacam que a estabilidade do RNA alvo e do próprio *switch* é um dos determinantes críticos da robustez dessas metodologias, motivando o desenvolvimento de estratégias específicas para mitigar a ação de RNases, como os “*degradation tuning* RNAs” (dtRNAs), que prolongam a vida útil do transcrito ao incorporar estruturas 5' otimizadas para evitar degradação por RNase, por exemplo. Ao mesmo tempo, tais abordagens ilustram que aumentar demais a estabilidade pode levar a maior vazamento no estado *OFF* e a falsos-positivos, exigindo um equilíbrio cuidadoso entre estabilidade e degradação (Ekdahl *et al.*, 2022).

Embora a degradação enzimática tenha impedido a obtenção de réplicas biológicas estatisticamente robustas, o sinal de cerca de 22 vezes acima do branco obtido com o sensor N1-f, aliado à recuperação de sinal com inibidores de RNase, fornece uma evidência de prova de conceito do sistema. Nesse contexto, os

resultados sugerem que a presença de RNases atuou como um dos fatores limitantes, contribuindo para a variabilidade entre ensaios, ainda que a integridade do RNA não tenha sido avaliada diretamente.

4.7 Investigação *in silico* dos sensores

Para elucidar as bases moleculares relacionadas à diferença de robustez observada entre os *switches*, foi realizada uma análise termodinâmica retrospectiva, correlacionando previsões de estabilidade estrutural com o desempenho experimental. Buscou-se determinar se as limitações de reprodutibilidade eram atribuíveis ao *design* molecular ou exclusivamente às condições adversas de laboratório.

A análise de cada sensor foi fundamentada em cinco parâmetros termodinâmicos complementares que descrevem o comportamento estrutural dos *designs* avaliados demonstrados na Tabela 8. A Energia livre mínima isolada (*Minimum Free Energy* - MFE isolada) corresponde à energia livre mínima da molécula na ausência do alvo em reação, sendo que valores mais negativos indicam maior estabilidade intrínseca do RNA. A MFE do complexo representa a energia livre mínima do heterodímero *toehold-trigger*; similarmente, a negatividade reflete maior afinidade estrutural. O *ensemble* do complexo descreve a energia média ponderada de todas as estruturas possíveis desse heterodímero e funciona como métrica de ruído conformacional; diferenças pequenas entre MFE e *ensemble* indicam comportamento mais previsível e menor dispersão estrutural. O ΔG de ligação quantifica a energia de hibridização entre *toehold* e *trigger*, com valores mais negativos indicando maior afinidade e velocidade de ativação. Por fim, a frequência de MFE, expressa em porcentagem, corresponde à fração de moléculas do *ensemble* que adotam exatamente a conformação de energia mínima. Valores elevados deste parâmetro estão associados a um comportamento conformacional mais robusto, com menor deslocamento estrutural e, conseqüentemente, menor exposição de regiões de fita simples suscetíveis à degradação por RNases (Bernhart *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2011).

Tabela 8. Avaliação das propriedades termodinâmicas dos biossensores baseados em *toehold switch*. Valores de energia livre mínima (MFE) da estrutura isolada do *switch* (MFE Isolada), do complexo *switch*-RNA alvo (MFE Complexo) e da energia livre do conjunto de estruturas previstas (*Ensemble* Complexo), bem como da variação de energia livre de ligação (ΔG Ligação), para os biossensores direcionados aos alvos H5 e N1. A coluna Frequência MFE indica a porcentagem de ocorrência da estrutura de energia mínima no conjunto estrutural previsto.

<i>Toehold</i>	Alvo	MFE Isolada	MFE Complexo	<i>Ensemble</i> Complexo	ΔG Ligação	Frequência MFE
a	H5	-27.30	-65.70	-67.29	-38.21	7.53%
b	H5	-31.80	-65.30	-66.83	-37.81	8.36%
c	H5	-27.20	-65.30	-66.83	-37.81	8.36%
d	N1	-38.70	-90.50	-92.27	-42.45	5.65%
e	N1	-39.00	-92.50	-93.76	-43.63	12.85%
f	N1	-35.50	-92.10	-92.97	-46.02	24.38%

A partir da análise dos parâmetros termodinâmicos descritos acima, verifica-se que, no grupo H5, o sensor H5-a apresenta afinidade de ligação ligeiramente superior, enquanto H5-b e H5-c exibem rigidez estrutural marginalmente maior (MFE isolada mais negativa e frequência MFE um pouco mais elevada); na prática, porém, os três sensores podem ser considerados termodinamicamente equivalentes e medianos. No grupo N1, observa-se um comportamento distinto: o sensor N1-d apresenta boa estabilidade e afinidade, mas a baixa frequência da estrutura MFE (5,65%) indica uma conformação relativamente flexível, o que reduz a previsibilidade funcional. O sensor N1-e constitui um candidato superior ao primeiro, com aproximadamente o dobro da frequência MFE, além de *ensemble* e ΔG de ligação mais favoráveis. Já o sensor N1-f destaca-se de forma clara, combinando a afinidade mais intensa de todo o conjunto com elevada rigidez estrutural e alta recorrência da conformação ativa (frequência MFE de 24,38%).

Notavelmente, N1-e e N1-f foram os dois sensores submetidos a engenharia racional de sequência para remoção de *stop-códons* prematuros (Quadros 2e-f). Embora essa alteração fosse motivada exclusivamente por necessidade translacional, ela aparentemente exerceu um impacto favorável sobre a estabilidade conformacional do RNA. Essa observação corrobora com evidências de que mutações sinônimas, embora neutras para a sequência proteica, podem remodelar a estrutura secundária do mRNA e alterar significativamente sua estabilidade termodinâmica e probabilidade de dobramento (Chamary; Hurst, 2005).

4.8 Validação experimental e correlação *in silico/in vitro*

Para compreender a diferença de robustez observada entre os sensores, correlacionaram-se os parâmetros termodinâmicos computacionais com o comportamento experimental sob degradação por RNases. A frequência elevada da estrutura MFE do sensor N1-f (24,38%) em relação ao H5-b (8,36%) sugere que uma proporção maior de moléculas deste sensor permanece estabilizada na conformação de mínima energia (Figura 21).

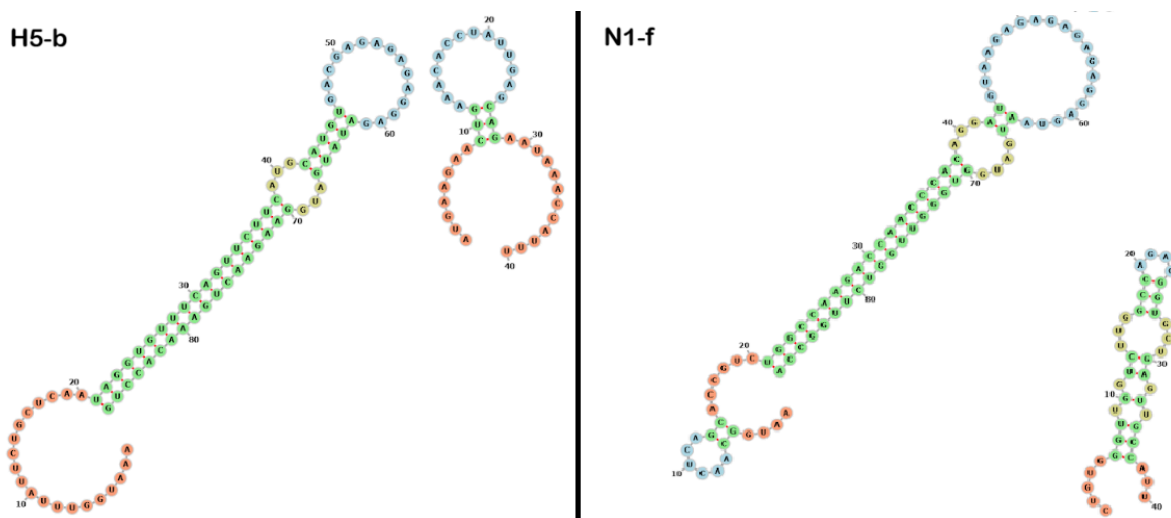


Figura 21. Comparação das estruturas secundárias previstas para os complexos H5-b e N1-f. Estruturas de mínima energia (MFE) previstas pelo *software* *RNAfold* para os sensores H5-b e N1-f. A notação circular evidencia diferenças estruturais relevantes entre os sensores: H5-b apresenta regiões extensas de loops não pareados nas extremidades (regiões destacadas em vermelho e azul), enquanto N1-f exibe um *stem* predominante (região verde) com loops menores e estruturalmente mais protegidos. A frequência da estrutura de MFE foi de 8,36% para H5-b e 24,38% para N1-f, indicando maior proporção de moléculas de N1-f estabilizadas na conformação de mínima energia. Predições realizadas *in silico* utilizando parâmetros termodinâmicos padrão. Fonte: *RNAcofold* (2025).

Essa geometria estrutural diferencial correlaciona-se fortemente com a robustez experimental observada: o sensor N1-f, caracterizado por menor exposição de regiões de fita simples, manteve funcionalidade sob estresse enzimático moderado, enquanto o H5-b exibiu degradação progressiva. A frequência MFE mais elevada de N1-f é compatível com um *ensemble* mais estruturado, o que tende a reduzir a fração de nucleotídeos em fita simples, justamente os sítios preferenciais de RNases (Zuo *et al.*, 2006). Como observado, na réplica 2 (condição de estresse moderado), a diferença estrutural entre os sensores constitui uma explicação plausível para os desempenhos funcionais contrastantes: N1-f manteve um *Fold Change* de 6,5 vezes, indicando persistência da capacidade detectora, enquanto H5-b apresentou colapso acentuado com *Fold Change* reduzido a 2,2 vezes,

praticamente inviabilizando a detecção. A diferença de robustez, ilustrada na Figura 22, mostra-se consistente com as previsões termodinâmicas *in silico*, sugerindo que a estabilidade estrutural predita pode contribuir para a resistência à degradação por RNases.

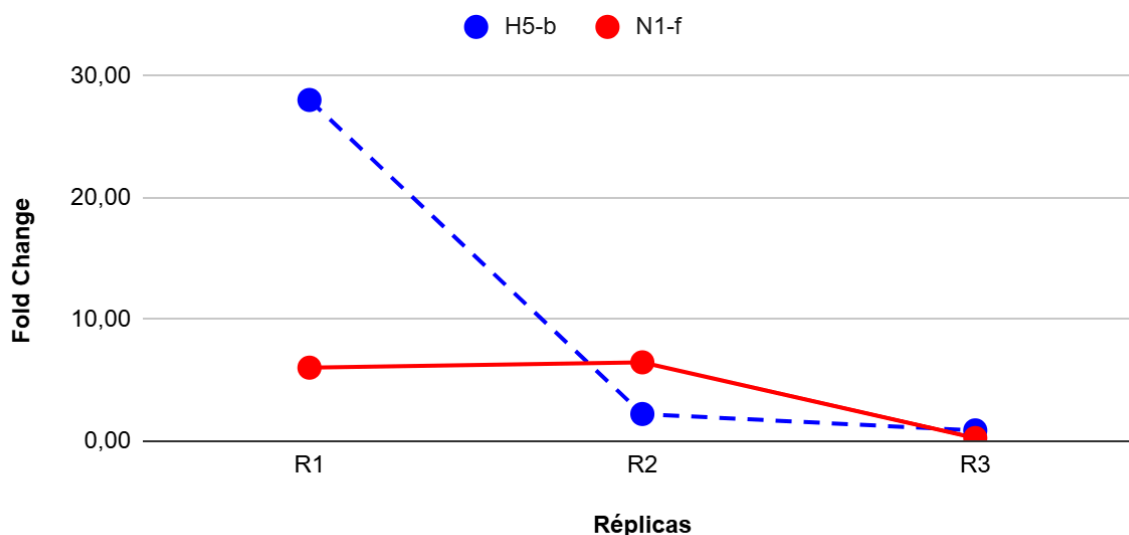


Figura 22. Evolução do *Fold Change* dos sensores H5-b e N1-f ao longo das réplicas R1-R3 sob degradação por RNases. *Fold Change* calculado a partir da razão entre a luminescência na presença (200 nM) e na ausência de RNA sintético alvo, para os sensores H5-b (azul, linha tracejada) e N1-f (vermelho, linha contínua), nas réplicas R1, R2 e R3. H5-b apresentou redução acentuada do sinal entre R1 (28,0) e R2 (2,2), sugerindo maior suscetibilidade à degradação, enquanto N1-f manteve valores relativamente estáveis entre R1 (6,0) e R2 (6,5). Em R3, ambos os sensores apresentaram colapso do sinal (valores <1), indicando perda funcional sob condições prolongadas de exposição a RNases. Dados referentes a um ensaio biológico sequencial (R1-R3).

A análise retrospectiva confirma que os sensores selecionados para validação experimental possuíam viabilidade termodinâmica, porém com graus contrastantes de robustez conformacional. A escolha do *switch* N1-f para aprofundamento experimental revelou-se justificada pelas métricas *in silico*: este sensor combinava a máxima afinidade de ligação, a maior rigidez conformacional e a frequência de MFE mais elevada, características que se correlacionaram com a funcionalidade superior e a resistência à degradação enzimática observadas na bancada. Assim, os resultados apontam para uma relação entre a estrutura termodinâmica predita e o desempenho funcional sob estresse, reforçando o papel do *design* computacional como ferramenta preditiva de robustez experimental.

Apesar das limitações associadas à degradação enzimática por RNases, o conjunto de experimentos permitiu identificar pontos críticos do protocolo, como o fracionamento de reagentes, o uso de alíquotas únicas, o controle rigoroso de

RNase e a definição adequada da quantidade total de DNA, bem como da proporção entre os módulos de detecção e resposta. A incorporação dessas melhorias indica perspectivas favoráveis para a aplicação da metodologia em cenários diagnósticos reais. Nesse contexto, abordagens baseadas em RNA já demonstraram eficácia na detecção específica de sequências virais, como observado para o vírus Zika, inclusive em sistemas estéreis, abióticos e com potencial uso em campo (Karlikow *et al.*, 2022). Dessa forma, um kit diagnóstico baseado em RNA voltado aos subtipos mais contagiosos de IA poderia, em princípio, viabilizar a detecção e a notificação da doença em poucas horas, reduzindo o intervalo entre a suspeita clínica e a confirmação laboratorial (Figura 23).

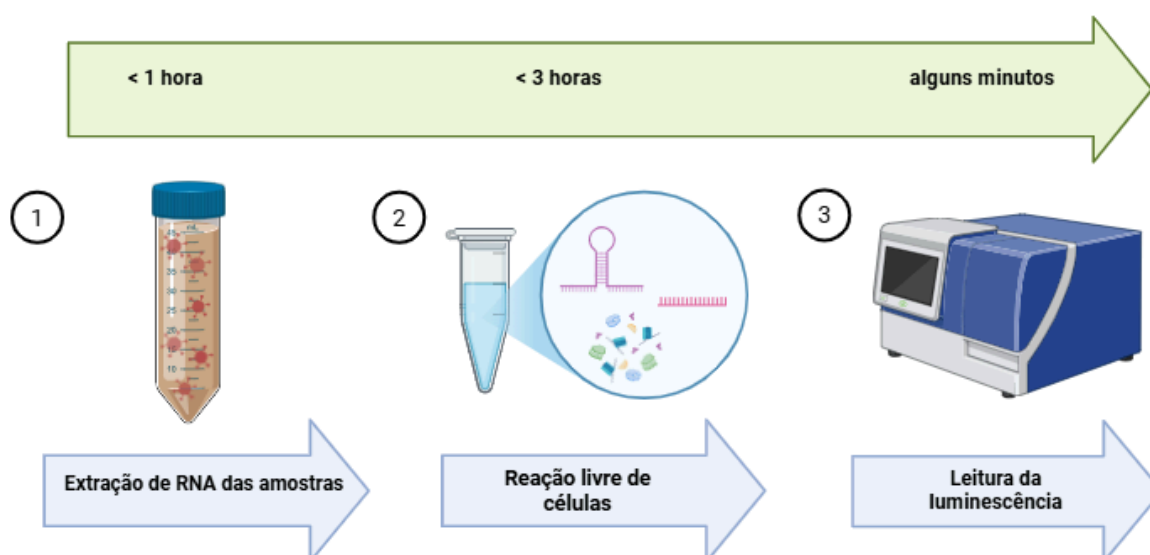


Figura 23. Fluxo de trabalho para detecção de RNA viral via biossensores *toehold switch*. O diagrama ilustra as três etapas principais: (1) extração do RNA alvo (< 1 hora); (2) ativação do biossensor em sistema livre de células (< 3 horas); e (3) quantificação do sinal por meio da leitura de luminescência (alguns minutos). Fonte: Adaptada de Merle (2021). Produzida em BioRender.

Os resultados obtidos neste trabalho se inserem nesse esforço mais amplo. Embora ainda em fase de prova de conceito e marcados por desafios técnicos, os experimentos realizados indicam a viabilidade de adaptar a estratégia de *toehold switches* acoplados a reações livres de células para a detecção de H5N1, ao mesmo tempo em que evidenciam a necessidade de rigor no controle de RNases, no manuseio de reagentes, na definição das condições de DNA e na preservação de estruturas termodinamicamente estáveis frente a fatores externos. Além disso, os dados reforçam a importância de estudos sistemáticos sobre o impacto de mutações

pontuais em biossensores, com vistas à seleção de dispositivos simultaneamente mais resistentes ao ambiente e com desempenho termodinâmico otimizado, em particular pela elevação da frequência de MFE, uma vez que este trabalho sustenta a hipótese de que frequências mais altas se associam a biossensores mais robustos e estruturalmente estáveis.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou a concepção e a avaliação inicial de um biossensor baseado em *toehold switches* acoplado a reações livres de células para detecção de sequências-alvo do VIA H5N1. O estudo abrangeu o desenho de sensores a partir de regiões conservadas dos segmentos H5 e N1, a construção e validação de plasmídeos correspondentes e sua aplicação em ensaios de prova de conceito. Entre os dispositivos testados, os sensores H5-b e, sobretudo, N1-f demonstraram desempenho inicial mais promissor, embora a reprodutibilidade tenha se mostrado fortemente dependente de condições experimentais estritamente controladas, com destaque para a integridade do RNA e a minimização da atividade de RNases. Embora ainda distante de um teste diagnóstico pronto para uso, o conjunto de resultados configura uma prova de conceito consistente, identifica etapas críticas do protocolo e oferece bases práticas para o refinamento futuro de biossensores rápidos, adaptáveis e termodinamicamente mais robustos, incluindo o uso racional de mutações de sequência para aumentar a estabilidade estrutural e a frequência de MFE.

6. LIMITAÇÕES, PERSPECTIVAS FUTURAS E CONTRIBUIÇÃO DO TRABALHO

Uma limitação relevante deste estudo foi a ausência, na fase inicial do projeto, de uma etapa sistemática de triagem *in silico* para a priorização de *switches* com propriedades termodinâmicas mais favoráveis antes da realização dos ensaios em bancada. A análise retrospectiva conduzida neste estudo demonstrou que parâmetros como frequência de MFE, MFE isolada, *ensemble* do complexo e ΔG de ligação permitem identificar, de forma antecipada, candidatos estruturalmente mais estáveis, como observado para o sensor N1-f na faixa mais elevada de frequência

de MFE. A incorporação dessa abordagem de seleção racional desde as etapas iniciais poderia ter reduzido o número de construções avaliadas experimentalmente e direcionado os esforços para biossensores com maior probabilidade de desempenho estável.

Adicionalmente, em função do número reduzido de réplicas biológicas e dos problemas metodológicos identificados ao longo da padronização, os resultados apresentados devem ser interpretados como descritivos e exploratórios, configurando uma prova de conceito do biossensor proposto.

Como perspectivas futuras, o trabalho abre caminho para a consolidação experimental do biossensor por meio da ampliação do número de réplicas biológicas em condições controladas. Nesse contexto, a validação do sistema com RNA proveniente de amostras biológicas reais constitui um passo fundamental para sua implementação ao contexto diagnóstico, ressaltando-se que esse material já está disponível no Laboratório de Biologia Sintética do Cenargen, tendo sido obtido por meio de parceria institucional com o MAPA. Paralelamente, a adaptação do ensaio para formatos mais simples e portáteis, como plataformas em papel ou dispositivos de campo, deverá ser explorada como estratégia para ampliar a aplicabilidade prática da metodologia. A avaliação de genes repórteres passíveis de detecção visual, como *sfgfp* ou *lacZ*, representa ainda uma linha promissora de investigação para viabilizar o uso do biossensor em ambientes descentralizados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKINA, R. K. et al. Intracellular localization of the viral polymerase proteins in cells infected with influenza virus and cells expressing PB1 protein from cloned cDNA. **Journal of virology**, v. 61, n. 7, p. 2217-2224, 1987.

ARAFI, A. et al. Evolution of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in Egypt indicating progressive adaptation. **Archives of virology**, v. 157, n. 10, p. 1931-1947, 2012.

ARAUJO, Andreina et al. Mortality in sea lions is associated with the introduction of the H5N1 clade 2.3. 4.4 b virus in Brazil October 2023: whole genome sequencing and phylogenetic analysis. **BMC Veterinary Research**, v. 20, n. 1, p. 285, 2024.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Relatório Anual 2025. São Paulo: ABPA, 2025. Disponível em:

<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2025/04/ABPA.-Relatorio-Anual-2025.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2026.

BAABU, Priyannth Ramasami S. et al. End-to-end computational approach to the design of RNA biosensors for detecting miRNA biomarkers of cervical cancer. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 802-814, 2022.

BANYARD, Ashley C. et al. Detection and spread of high pathogenicity avian influenza virus H5N1 in the Antarctic Region. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 7433, 2024.

BERNHART, Stephan H. et al. Partition function and base pairing probabilities of RNA heterodimers. **Algorithms for Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 3, 2006.

BOUVIER, Nicole M.; PALESE, Peter. The biology of influenza viruses. **Vaccine**, v. 26, p. D49-D53, 2008.

BOYD, Margrethe A. et al. Robust and tunable performance of a cell-free biosensor encapsulated in lipid vesicles. **Science advances**, v. 9, n. 1, p. eadd6605, 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ficha Técnica: Influenza Aviária (IA). In: Departamento de Saúde Animal. Fichas Técnicas de Doenças Animais. Brasília: MAPA, jul. 2020. p. 1-26. Disponível em: <https://www.iagro.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/12/Fichas-Tecnicas-todas.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento do Programa Nacional de Imunizações. Guia de vigilância da influenza aviária em humanos. Brasília: Ministério da Saúde, 2024a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/guias-e-manuais/2024/guia-influenza-aviaria>. Acesso em: 12 dez. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Painel de Indicadores: Saúde Animal (SRN). Brasília, DF: MAPA, 2024b. Disponível em: <https://mapa-indicadores.agricultura.gov.br/publico/extensions/SRN/SRN.html>. Acesso em: 07 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Ficha Técnica: Influenza Aviária (IA). Brasília, DF: MAPA, 2025a. Disponível em: https://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/fichas_tecnicas/Ficha-Tecnica_IA.pdf. Acesso em: 07 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Ficha Técnica: Influenza Aviária (IA). Brasília, DF: MAPA, julho de 2025b. Disponível em: https://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/fichas_tecnicas/Ficha-Tecnica_IA.pdf. Acesso em: 07 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Nota Técnica nº 32/2025/DSA/SDA/MAPA: Atualização sobre ocorrência de influenza aviária de alta patogenicidade (H5N1) no Brasil. Brasília, DF: MAPA, 18 de junho de 2025c. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202506/24132658-nota-tecnica-43423219-sei-mapa-43403052-nota-tecnica-32-por-1.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2026

BUCKO, Marie; GIEGER, Samantha. Low-Pathogenicity Avian Influenza. Technical Disease Cards. OIE (World Organisation for Animal Health), 2019. Com assistência do USGS National Wildlife Health Center. Disponível nos arquivos da OIE/WOAH.

BURNET, F. M.; MCCREA, J. F.; ANDERSON, S. G. Mucin as substrate of enzyme action by viruses of the mumps influenza group. **Nature**, v. 160, n. 4064, p. 404-405, 1947.

CASERTA, Leonardo C. et al. Transmissão do vírus da influenza aviária H5N1 altamente patogênico para gado leiteiro. **Nature**, p. 1-3, 2024.

CATTOLI, Giovanni et al. Highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in Africa: a comprehensive phylogenetic analysis and molecular characterization of isolates. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4842, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Types of Influenza Viruses. 2024a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses-types.html> Acesso em: 03 ago. 2025.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). CDC confirms second human H5 bird flu case in Michigan, third case tied to dairy outbreak. Atlanta: CDC, 30 maio 2024b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/media/releases/2024/p0530-h5-human-case-michigan.html>. Acesso em: 06 jan. 2026.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus: Interim Recommendations for Prevention, Monitoring, and Public Health Investigations. Atlanta: CDC, 2025a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/bird-flu/prevention/hpai-interim-recommendations.html>. Acesso em: 07 nov. 2025.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Guidelines for Laboratory Biosafety: Handling and Processing Specimens Potentially Containing Novel Influenza A Viruses, Including HPAI A(H5N1). Atlanta: CDC, 2025b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/bird-flu/php/severe-potential/guidelines-for-laboratory-biosafety.html>. Acesso em: 07 nov. 2025.

CLAAS, Eric CJ et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. **The Lancet**, v. 351, n. 9101, p. 472-477, 1998.

CHAMARY, Jean-Vincent; HURST, Laurence D. Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals. **Genome biology**, v. 6, n. 9, p. R75, 2005.

CHEN, Hualan et al. Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. **Journal of virology**, v. 80, n. 12, p. 5976-5983, 2006.

CHEUNG, Timothy KW; POON, Leo LM. Biology of influenza a virus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1102, n. 1, p. 1-25, 2007.

CHOPPIN, Purnell W.; COMPANS, Richard W. The structure of influenza virus. **The influenza viruses and influenza**, p. 15-51, 1975.

CHOTPITAYASUNONDH, Tawee et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 201, 2005.

DENG, Yi-Mo et al. Influenza A (H5N1) virus clade 2.3.2.1 a in traveler returning to Australia from India, 2024. **Emerging Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 135, 2025.

DETJEN, BARBARA MORGAN et al. The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. **Journal of virology**, v. 61, n. 1, p. 16-22, 1987.

EKDAHL, Alyssa M. et al. Engineering Toehold-mediated switches for native RNA detection and regulation in bacteria. **Journal of Molecular Biology**, v. 434, n. 18, p. 167689, 2022.

EL-SHESHENY, Rabeh et al. Molecular characterization of avian influenza H5N1 virus in Egypt and the emergence of a novel endemic subclade. **Journal of General Virology**, v. 95, n. 7, p. 1444-1463, 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION, CONTROL, EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR AVIAN INFLUENZA et al. Avian influenza overview September-December 2021. **EFSA Journal**, v. 19, n. 12, p. e07108, 2021.

EVOLUTION WORKING GROUP et al. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 7, p. e1, 2008.

FIOCRUZ. Influenza Aviária A (H5N1) no Brasil. 2023. Disponível em: <https://arca.fiocruz.br/handle/icict/59196>. Acesso em: 23 set. 2023.

FIOCRUZ. Influenza / Influenza vírus. 2025. Disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/glossario/>. Acesso em: 15 set. 2025.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Increased risk of high pathogenicity avian influenza introduction and spread in Africa. Rome: FAO, 22 dez. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cd7993en>. Acesso em: 08 jan. 2026.

FRANCO, Rafael et al. Signal-amplification for cell-free biosensors, ananalog-to-digital converter. **bioRxiv**, p. 2023.04.14.536885, 2023.

GARCÍA-SASTRE, Adolfo et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. **Virology**, v. 252, n. 2, p. 324-330, 1998.

GIAKOUNTIS, Antonis et al. Development of Toehold switches as a novel ribodiagnostic method for west nile virus. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 237, 2023.

GOMIDE, Mayna da Silveira. Funcionalidade de serina integrases no controle de interruptores genéticos em plantas. 2020.

GOTTSCHALK, Alfred. Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and Vibrio cholerae. **Biochimica et biophysica acta**, v. 23, n. 3, p. 645-646, 1957.

GREEN, Alexander A. et al. Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 925-939, 2014.

GREGORIO, Nicole E.; LEVINE, Max Z.; OZA, Javin P. A user's guide to cell-free protein synthesis. **Methods and protocols**, v. 2, n. 1, p. 24, 2019.

GRUBER AR, LORENZ R, BERNHART SH, NEUBÖCK R, HOFACKER IL. The Vienna RNA Websuite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, Issue suppl_2, 1 July 2008, Pages W70-W74, DOI: 10.1093/nar/gkn188.

HIRST, GEORGE K. Adsorption of influenza hemagglutinins and virus by red blood cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 76, n. 2, p. 195-209, 1942.

HONDA, Ayae; MIZUMOTO, Kiyohisa; ISHIHAMA, Akira. Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 20, p. 13166-13171, 2002.

HUNT, J. Porter et al. Towards detection of SARS-CoV-2 RNA in human saliva: A paper-based cell-free Toehold switch biosensor with a visual bioluminescent output. **New Biotechnology**, v. 66, p. 53-60, 2022.

JAMES, Joe et al. O papel das partículas transportadas pelo ar na epidemiologia do vírus da gripe aviária H5N1 de alta patogenicidade, clade 2.3.4.4b, em unidades comerciais de produção avícola. **Viruses**, v. 15, n. 4, p. 1002, 2023.

JOHNSON, Niall PAS; MUELLER, Juergen. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. **Bulletin of the History of Medicine**, v. 76, n. 1, p. 105-115, 2002.

KANG, Xiaodan et al. Development of a cell-free Toehold switch for hepatitis A virus type I on-site detection. **Analytical Methods**, v. 15, n. 43, p. 5813-5822, 2023.

KARLIKOW, Margot et al. Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika and chikungunya viruses in serum samples. **Nature Biomedical Engineering**, v. 6, n. 3, p. 246-256, 2022.

KIM, Hye-Ryoung et al. Highly pathogenic avian influenza (H5N1) outbreaks in wild birds and poultry, South Korea. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 480, 2012.

LAMB, Robert A. Genes and proteins of the influenza viruses. In: The influenza viruses. Boston, MA: **Springer US**, p. 1-871989.

LEE, Chang-Won et al. Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. **Journal of virology**, v. 79, n. 6, p. 3692-3702, 2005.

LEE, Dong-Hun et al. Highly pathogenic avian influenza viruses and generation of novel reassortants, United States, 2014-2015. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 7, p. 1283, 2016.

LEVINE, Max Z. et al. Escherichia coli-Based Cell-Free Protein Synthesis: Protocols for a robust, flexible, and accessible platform technology. **Journal of visualized experiments**, n. 144, 2019.

LEWIS, Nicola S. et al. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3. 4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. **Emerging Microbes & Infections**, v. 10, n. 1, p. 148-151, 2021.

LORENZ, Ronny et al. ViennaRNA Package 2.0. **Algorithms for molecular biology**, v. 6, n. 1, p. 26, 2011.

MACLACHLAN, Matthew J.; BOUSSIOS, David; HAGERMAN, Amy D. Market Responses to Export Restrictions from Highly Pathogenic Avian Influenza Outbreaks. **Journal of Agricultural and Resource Economics**, v. 47, n. 1, p. 209-224, 2021.

MCSWEENEY, Megan A. et al. Short activators and repressors of RNA toehold switches. **ACS Synthetic Biology**, v. 12, n. 3, p. 681-688, 2023.

MERLE, Louise. Toehold Switch: a new synthetic biology approach for diagnosis. 2021.

NEMEROFF, Martin E. et al. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. **Molecular cell**, v. 1, n. 7, p. 991-1000, 1998.

NIRENBERG, Marshall W.; MATTHAEI, J. Heinrich. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 47, n. 10, p. 1588-1602, 1961.

OLOWU, Babatunde Ibrahim et al. Propagation of Emerging and Re-Emerging Infectious Disease Pathogens in Africa: The Role of Migratory Birds. **Bacteria**, v. 5, n. 1, p. 2, 2026.

O'NEILL, Robert E.; TALON, Julie; PALESE, Peter. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. **The EMBO journal**, 1998.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). H5N1 influenza has killed more than 300 million birds worldwide in 2021. 2024. Disponível em: <https://news.un.org/pt/storhttps://news.un.org/pt/story/2024/12/1842226y/2024/12/1842226> Acesso em: 19 set. 2025.

PALESE, Peter. The genes of influenza virus. **Cell**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 1977.

PALMA, Marco. Consensus-Guided Construction of H5N1-Specific and Universal Influenza a Multiepitope Vaccines. **Biology**, v. 14, n. 10, p. 1327, 2025.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Risk Assessment for public health related to outbreaks caused by Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) A (H5N1), clade 2.3.4.4b, in animal species in the Region of the Americas - 20 September 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/avaliacao-risco-saude-publica-relacionada-aos-urtos-influenza-aviaria-alta>. Acesso em: 24 set. 2023.

PARDEE, Keith et al. based synthetic gene networks. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 940-954, 2014.

PARDEE, Keith et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1255-1266, 2016.

PEREIRA, H. G.; TŮMOVÁ, B.; LAW, V. G. Avian influenza A viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 32, n. 6, p. 855, 1965.

PERRONCITO, Edoardo. Epizootia tifoide nei gallinacei. **Annali Accad. Agri.** Torino., p. 87-126, 1878.

PINTO, Lawrence H.; HOLSINGER, Leslie J.; LAMB, Robert A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. **cell**, v. 69, n. 3, p. 517-528, 1992.

PIORINO, Fernanda et al. Plasmid Crosstalk in Cell-Free Expression Systems. **ACS Synthetic Biology**, v. 12, n. 10, p. 2843-2856, 2023.

PRINZI, A.; ROHDE, R. E. Avian influenza: past, present, future. **American Society for Microbiology**. 2022.

ROCHA, Amanda P. et al. Cell-Free Production of Soybean Leghemoglobins and Nonsymbiotic Hemoglobin. **ACS Synthetic Biology**, v. 14, n. 9, p. 3445-3456, 2025.

SALES, Thais Torquato et al. There and turn back again: the application of phage serine integrases in eukaryotic systems. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 13, p. 1478413, 2025.

SALZBERG, Steven L. et al. Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 5, p. 713, 2007.

SAMJI, Tasleem. Influenza A: understanding the viral life cycle. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 82, n. 4, p. 153, 2009.

SCHULMAN, JEROME L.; PALESE, PETER. Virulence factors of influenza A viruses: WSN virus neuraminidase required for plaque production in MDBK cells. **Journal of virology**, v. 24, n. 1, p. 170-176, 1977.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANTARCTIC RESEARCH (SCAR). Updated Biological Risk Assessment and Recommendations for Highly Pathogenic Avian Influenza in Antarctica. SCAR Antarctic Wildlife Health Network, 18 dez. 2024. Disponível em:

<https://scar.org/scar-news/life-sciences/awhn-news/scar-hpai-update-bulletin>. Acesso em: 07 jan. 2026.

SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG). Influenza Aviar (IA). Disponível em: <https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/influenza-aviar-ia>. Acesso em: 24 set. 2023.

SPACKMAN, Erica. Avian influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. In: Animal Influenza Virus: Methods and Protocols. New York, NY: **Springer US**, p. 137-148, 2020.

SWAYNE, David. Avian Influenza. MSD Manual Veterinary Manual, junho 2023. Disponível em: <https://www.msdsmanual.com/poultry/avian-influenza/avianinfluenza>. Acesso em: 23 set. 2023.

SWAYNE, D. E. et al. Strategic challenges in the global control of high pathogenicity avian influenza. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, p. 89-102, 2024.

TAUBENBERGER, Jeffery K.; KASH, John C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 6, p. 440-451, 2010.

TIENSIN, Thanawat et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1, Thailand, 2004. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 11, p. 1664, 2005.

TONG S, ZHU X, LI Y, SHI M, ZHANG J, BOURGEOIS M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. **PLoS Pathog.**, v. 9, 2013.

ULLOA, Mauricio et al. Mass mortality event in South American sea lions (*Otaria flavescens*) correlated to highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 outbreak in Chile. **Veterinary Quarterly**, v. 43, n. 1, p. 1-10, 2023.

WANG, Luyao et al. Serine integrase-based recombination enables direct plasmid assembly in vivo. **Synthetic Biology and Engineering**, v. 1, n. 3, p. 10017, 2023.

WEINBERG, Benjamin H. et al. Large-scale design of robust genetic circuits with multiple inputs and outputs for mammalian cells. **Nature biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 453-462, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. Updated unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. Geneva: World Health Organization, 2011. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/global-influenza-surveillance-and-response-system/nomenclature/updated_nomenclature_system_h5n1_avian_influenza_viruses.pdf?sfvrsn=73b9d9a6_8. Acesso em: 07 jan. 2026.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). Avian Influenza. Paris: WOAH, 2024. Disponível em: <https://www.woah.org/en/disease/avian-influenza/>. Acesso em: 07 jan. 2026.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). High Pathogenicity Avian Influenza (HPAI) - Situation Report. setembro de 2023. Disponível em: <https://www.woah.org/app/uploads/2023/09/hpai-situation-report-20230915-002.pdf>. Acesso em: 24 set. 2023.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). High Pathogenicity Avian Influenza (HPAI) Situation Report 77: Period covered: November 2025. Paris: WOAH, 2025. Disponível em: High Pathogenicity Avian Influenza (HPAI) - Situation Report 77 - WOAH - World Organisation for Animal Health. Acesso em 07 jan. 2026.

XIE, Zimin et al. Clade 2.3.4.4b highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: knowns, unknowns, and challenges. **Journal of Virology**, p. e00424-25, 2025.

ZHAO, Guo et al. Novel reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China. 2012.

ZUO, Yuhong et al. Structural basis for processivity and single-strand specificity of RNase II. **Molecular cell**, v. 24, n. 1, p. 149-156, 2006.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A - CONSTRUÇÕES E SEQUÊNCIAS DOS PLASMÍDEOS

Abaixo encontram-se as figuras referentes aos alinhamentos múltiplos de sequências realizados neste trabalho:

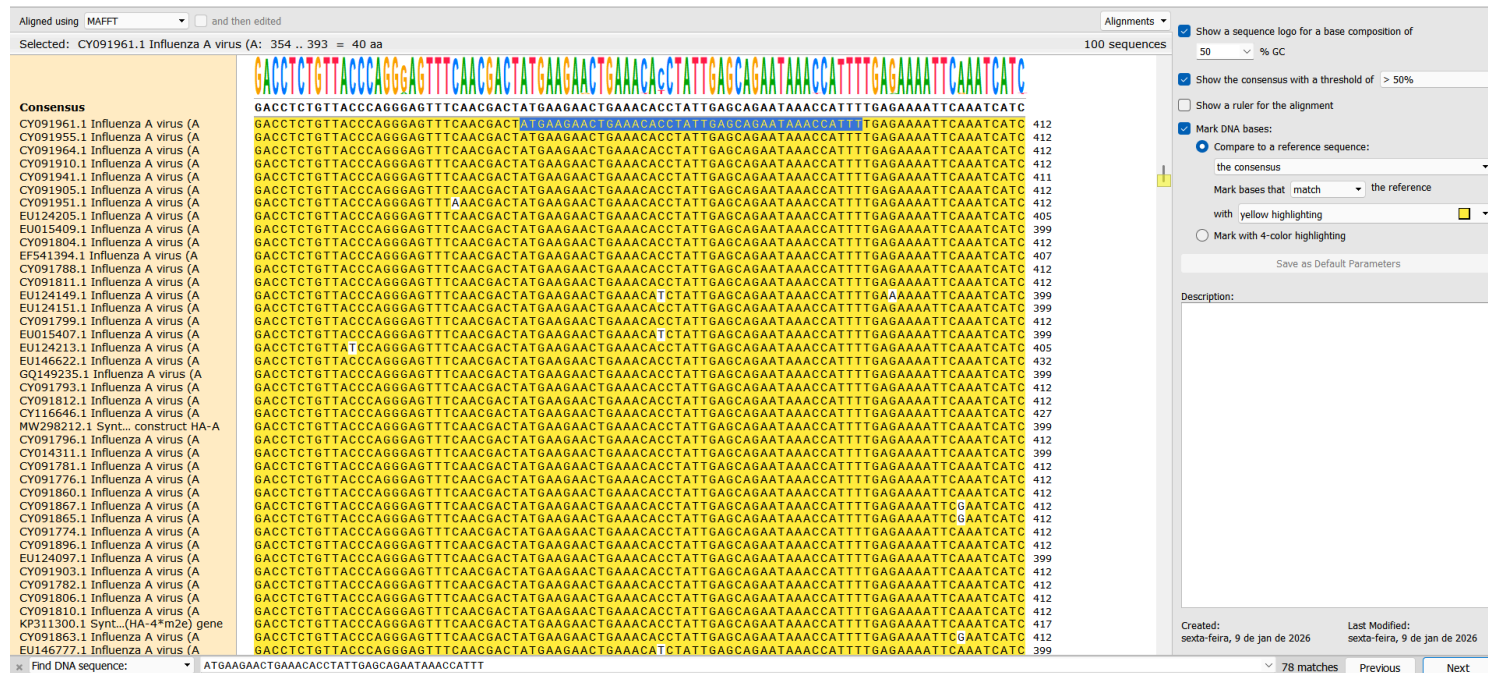


Figura A1. Alinhamento múltiplo de sequências do gene HA (H5). Alinhamento múltiplo correspondente ao segmento de 40 nucleotídeos utilizado como alvo para o desenho do módulo de detecção dos *switches* H5-a,b,c. As sequências analisadas, provenientes de diferentes isolados virais, foram comparadas quanto à conservação da região de interesse. As posições não conservadas estão destacadas em branco no alinhamento. A região selecionada apresenta 78% de sequências totalmente conservadas nesse segmento de 40 nucleotídeos.

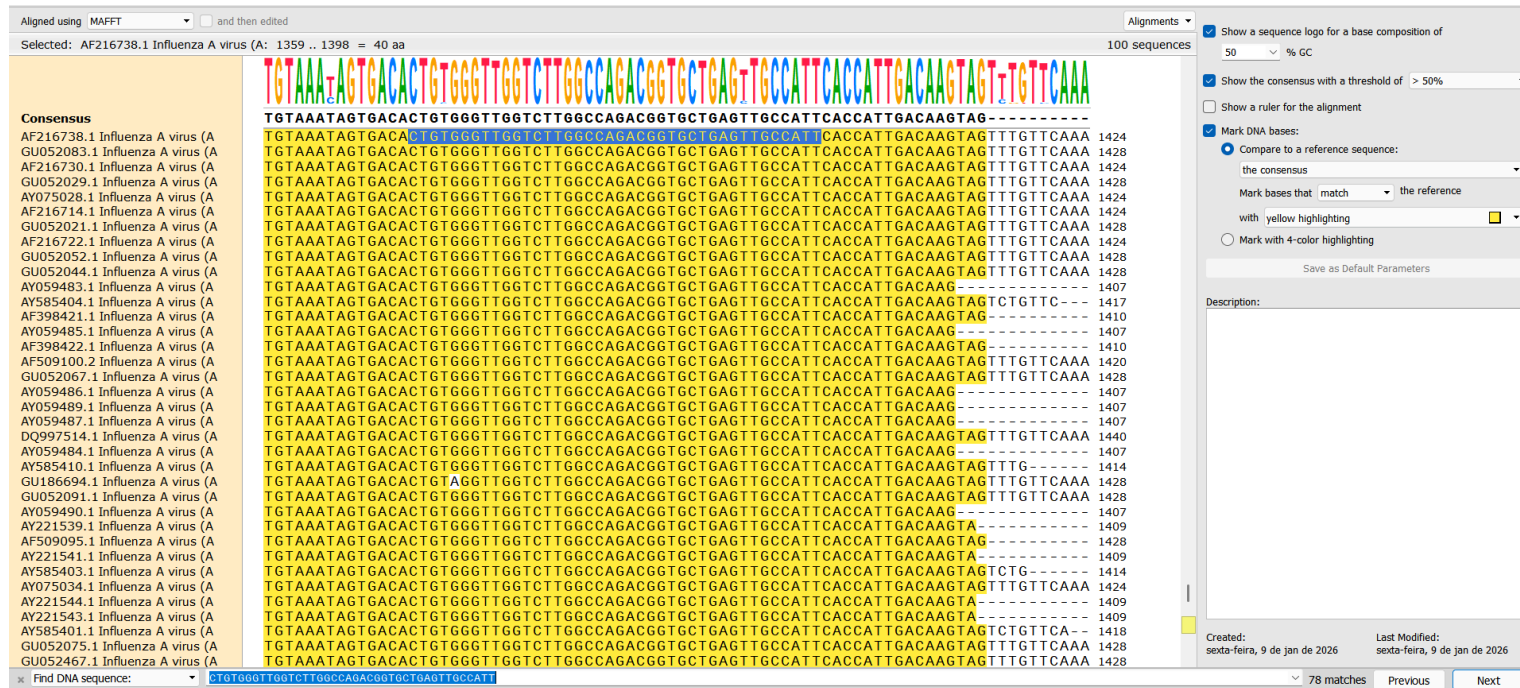


Figura A2. Alinhamento múltiplo de seqüências do gene NA (N1). Alinhamento múltiplo correspondente ao segmento de 40 nucleotídeos utilizado como alvo para o desenho do módulo de detecção dos *switches* N1-d,e,f. As seqüências analisadas, provenientes de diferentes isolados virais, foram comparadas quanto à conservação da região de interesse. As posições não conservadas estão destacadas em branco no alinhamento. A região selecionada apresenta 78% de seqüências totalmente conservadas nesse segmento de 40 nucleotídeos

Abaixo encontram-se as representações dos módulos de detecção seguido das suas respectivas sequências:

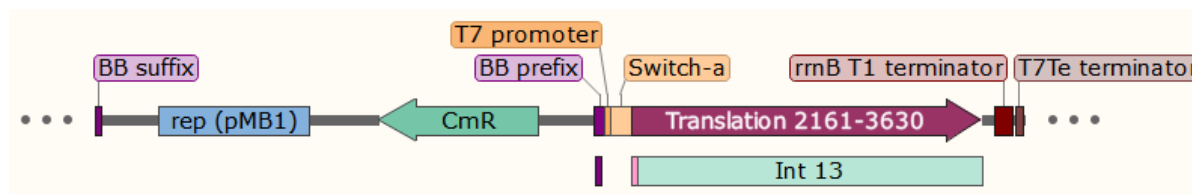


Figura A3. Mapa esquemático do primeiro plasmídeo construído para o subtipo H5 (*switch* H5-a). Representação gráfica dos principais elementos genéticos presentes no plasmídeo, incluindo a origem de replicação (rep pMB1), o marcador de resistência a cloranfenicol (CmR), o promotor T7, as regiões BB prefix e BB suffix, a sequência correspondente ao módulo do *switch* inserido na região de tradução (nt 2161-3630), o terminador rrnB T1 e o terminador T7. O esquema indica a organização e a orientação dos elementos no módulo de detecção.

Sequência da Figura A3. Sequência nucleotídica completa do primeiro plasmídeo construído para o subtipo H5 (*switch* H5-a). Sequência integral do constructo plasmidial representado na Figura A3, incluindo o *backbone* e o inserto correspondente ao módulo do *switch*. A sequência é apresentada no sentido 5'-3'.

5' -ATATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAAAGGGCAAGGTGTCACCACCCTGCCCTTTTTCTTTAAACCGAAAAGATTACTTCGCGTT
ATGCAGGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG
AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCACAGGCT
CCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGC
TCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT
GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTA
TCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAG
ATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGCTCGAGGCTTGGATTCTCACCAATAAAAA
ACGCCCCGGCGCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCGAGCTCGATATCAA
ATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAAT
CGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCA

AAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCA
CATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAATCGTCGTGGTATTCCTCCAGAGCGATGAAAACGTTTTAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTA
ACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTTCATTGCCATACGAAATTCGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATA
AAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTG
ACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCC
TGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCCGGTAGTGATCTTATTTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCCCGATCAACTCGAGTGCC
ACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTTTCAGATAAAAAAAATCCTTAGCTTTC
GCTAAGGATGATTTCTGGAATTCCAGAAATCATCCTTAGCGATGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAATGGTT
TATTCTGCTCAATAGGTGTTTCAGTTCTTCATGTATGTGGGAGAGAAGAGGAGATATGATGGAAGAACTGAAACACTTGGTCGACTCGACGGCAGCG
CAAAAGGCGGTTGGTATCTACATCCGTGTTTCTACCCAGGAACAGGCGTCTGAAGGTCACTCTATCGAATCTCAGAAAAAAACTGGCGTCTTACT
GCGAAATCCAGGGTTGGGACGACTACCGTTTCTACATCGAAGAAGGTATCTCTGGTAAAAACACCAACCGTCCGAAACTGAACTGCTGATGGAACA
CATCGAAAAAGGTAAAAATCAACATCCTGCTGGTTTACCGTCTGGACCGTCTGACCCGTTCTGTTATCGACCTGCACAACTGCTGAACTTCCTGCAG
GAACACGGTTGCGCGTTCAAATCTGCGACCGAAACCTACGACACCACCACCGCGAACGGTCGTATGTCTATGGGTATCGTTTTCTCTGCTGGCGCAGT
GGGAAACCGAAAAACATGTCTGAACGTATCAAACCTGAACCTGGAACACAAAGTTCTGGTTGAAGGTGAACGTGTTGGTGCGATCCCGTACGGTTTCGA
CCTGTCTGACGACGAAAAACTGGTTAAAAACGAAAAATCTGCGATCCTGCTGGACATGGTTGAACGTGTTGAAAACGGTTGGTCTGTTAACCGTATC
GTTAACCTACCTGAACCTGACCAACAACGACCGTAACCTGGTCTCCGAACGGTGTTCTGCGTCTGCTGCGTAACCCGGCGCTGTACGGTGCAGCCCGTT
GGAACGACAAAATCGCGGAAAAACCCACGAAGGTATCATCTCTAAAGAACGTTTCAACCGTCTGCAGCAGATCCTGGCGGACCGTTCTATCCACCA
CCGTGCTGACGTTAAAGGTACCTACATCTTCCAGGGTGTTCTGCGTTGCCCGGTTTGCGACCCAGACCCCTGTCTGTTAACCGTTTTATCAAAAAACGT
AAAGACGGTACCGAATACTGCGGTGTTCTGTACCGTTGCCAGCCGTGCATCAAACAGAACAAATACAACCTGGCGATCGGTGAAGCGCGTTTTCTGA
AAGCGCTGAACGAATACATGTCTACCGTTGAATTCCAGACCGTTGAAGACGAAGTTATCCCGAAAAATCTGAACGTGAAATGCTGGAATCTCAGCT
GCAGCAGATCGCGCGTAAACGTGAAAAATACCAGAAAGCGTGGGCGTCTGACCTGATGTCTGACGACGAATTCGAAAAACTGATGGTTGAAACCCGT
GAAACCTACGACGAATGCAAACAGAACTGGAATCTTGCGAAGACCCGATCAAATCGACGAAACCTACCTGAAAGAAATCGTTTACATGTTCCACC
AGACCTTCAACGACCTGGAATCTGAAAAACAGAAAGAATTCATCTCTAAATTCATCCGTACCATCCGTTACACCGTTAAAGAACAGCAGCCGATCCG
TCCGGACAAATCTAAAACCGGTAAAGGTAAACAGAAAGTTATCATCACCGAAGTTGAATTCTACCAGTAAGCTTGATGGGGGATCCCATGGTACGCG
TGCTAGAGGCATCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCTACTA
GAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGTTT-3'

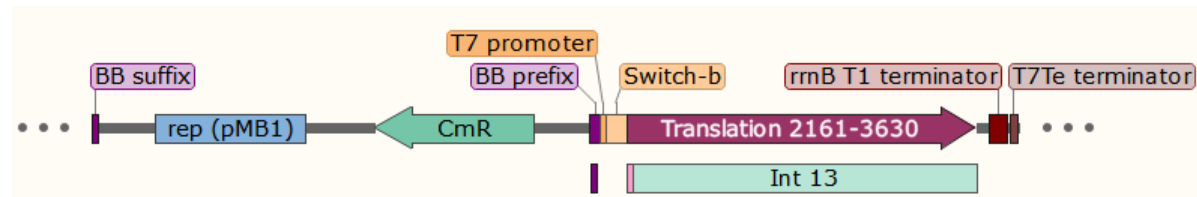


Figura A4. Mapa esquemático do segundo plasmídeo construído para o subtipo H5 (*switch* H5-b). Representação gráfica dos principais elementos genéticos presentes no plasmídeo, incluindo a origem de replicação (rep pMB1), o marcador de resistência a cloranfenicol (CmR), o promotor T7, as regiões BB prefix e BB suffix, a sequência correspondente ao módulo do *switch* inserido na região de tradução (nt 2161-3630), o terminador rrnB T1 e o terminador T7. O esquema indica a organização e a orientação dos elementos no módulo de detecção.

Sequência da Figura A4. Sequência nucleotídica completa do segundo plasmídeo construído para o subtipo H5 (*switch* H5-b). Sequência integral do constructo plasmidial representado na Figura A4, incluindo o *backbone* e o inserto correspondente ao módulo do *switch*. A sequência é apresentada no sentido 5'-3'.

5' -ATATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAAAAGGGCAAGGTGTCACCACCCTGCCCTTTTTCTTTAAACCGAAAAGATTACTTCGCGTT
 ATGCAGGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG
 AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCACAGGCT
 CCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGC
 TCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT
 GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC
 TCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
 GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
 GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
 TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAG
 ATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGCTCGAGGCTTGGATTCTCACCAATAAAAA
 ACGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCGAGCTCGATATCAA

ATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAAT
CGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCA
AAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCA
CATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTA
ACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTACCGTCTTTCATTGCCATACGAAATTCGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATA
AAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTG
ACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCC
TGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCCGATCAACTCGAGTGCC
ACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTTTACAGATAAAAAAAATCCTTAGCTTTC
GCTAAGGATGATTTCTGGAATTCCAGAAATCATCCTTAGCGATGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAATGGTT
TATTCTGCTCAATAGGTGTTTCAGTTCTTCATGCATGTGACGAGAGAGAGGAGATATGATGGAAGAACTGAAACACCTGGTCGACTCGACGGCAGCG
CAAAAGGCGGTTGGTATCTACATCCGTGTTTCTACCCAGGAACAGGCGTCTGAAGGTCACTCTATCGAATCTCAGAAAAAAAATGCGCTCTTACT
GCGAAATCCAGGGTTGGGACGACTACCGTTTCTACATCGAAGAAGGTATCTCTGGTAAAAACACCAACCGTCCGAAACTGAACTGCTGATGGAACA
CATCGAAAAAGGTAAAATCAACATCCTGCTGGTTTACCGTCTGGACCGTCTGACCCGTTCTGTTATCGACCTGCACAACTGCTGAACTTCCTGCAG
GAACACGGTTGCGCGTTCAAATCTGCGACCGAAACCTACGACACCACCACCGCGAACGGTCGTATGTCTATGGGTATCGTTTTCTCTGCTGGCGCAGT
GGGAAACCGAAAACATGTCTGAACGTATCAAACTGAACCTGGAACACAAAGTTCTGGTTGAAGGTGAACGTGTTGGTGCGATCCCGTACGGTTTCGA
CCTGTCTGACGACGAAAACTGGTTAAAAACGAAAAATCTGCGATCCTGCTGGACATGGTTGAACGTGTTGAAAACGGTTGGTCTGTTAACCGTATC
GTAACTACCTGAACCTGACCAACAACGACCGTAACTGGTCTCCGAACGGTGTTCTGCGTCTGCTGCGTAACCCGGCGCTGTACGGTGCGACCCGTT
GGAACGACAAAAATCGCGGAAAACACCCACGAAGGTATCATCTCTAAAGAACGTTTCAACCGTCTGCAGCAGATCCTGGCGGACCGTTCTATCCACCA
CCGTCTGACGTTAAAGGTACCTACATCTTCCAGGGTGTTCTGCGTTGCCCGGTTTGCGACCAGACCCTGTCTGTTAACCGTTTCATCAAAAAACGT
AAAGACGGTACCGAATACTGCGGTGTTCTGTACCGTTGCCAGCCGTGCATCAAACAGAACAAATACAACCTGGCGATCGGTGAAGCGCGTTTCCTGA
AAGCGCTGAACGAATACATGTCTACCGTTGAATTCCAGACCGTTGAAGACGAAGTTATCCCGAAAAATCTGAACGTGAAATGCTGGAATCTCAGCT

GCAGCAGATCGCGCGTAAACGTGAAAAATACCAGAAAGCGTGGGCGTCTGACCTGATGTCTGACGACGAATTCGAAAAACTGATGGTTGAAACCCGT
GAAACCTACGACGAATGCAAACAGAACTGGAATCTTGCGAAGACCCGATCAAAATCGACGAAACCTACCTGAAAGAAATCGTTTACATGTTCCACC
AGACCTTCAACGACCTGGAATCTGAAAAACAGAAAGAATTCATCTCTAAATTCATCCGTACCATCCGTTACACCGTTAAAGAACAGCAGCCGATCCG
TCCGGACAAATCTAAAACCGGTAAAGGTAAACAGAAAGTTATCATCACCGAAGTTGAATTCTACCAGTAAGCTTGATGGGGGATCCCATGGTACGCG
TGCTAGAGGCATCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCTACTA
GAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCGCGTTT-3'

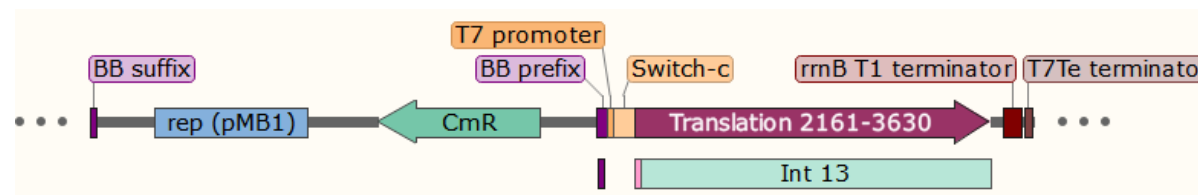


Figura A5. Mapa esquemático do terceiro plasmídeo construído para o subtipo H5 (*switch* H5-c). Representação gráfica dos principais elementos genéticos presentes no plasmídeo, incluindo a origem de replicação (rep pMB1), o marcador de resistência a cloranfenicol (CmR), o promotor T7, as regiões BB prefix e BB suffix, a sequência correspondente ao módulo do *switch* inserido na região de tradução (nt 2161-3630), o terminador rrnB T1 e o terminador T7. O esquema indica a organização e a orientação dos elementos no módulo de detecção.

Sequência da Figura A5. Sequência nucleotídica completa do terceiro plasmídeo construído para o subtipo H5 (*switch* H5-c). Sequência integral do constructo plasmidial representado na Figura A5, incluindo o *backbone* e o inserto correspondente ao módulo do *switch*. A sequência é apresentada no sentido 5'-3'.

5' -ATATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAAAAGGGCAAGGTGTCACCACCCTGCCCTTTTTCTTTAAACCGAAAAGATTACTTCGCGTT
ATGCAGGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG
AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTTGCTGGCGTTTTTCCACAGGCT
CCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGC
TCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCCTCATAGCTCACGCT
GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTA

TCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAG
ATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGCTCGAGGCTTGGATTCTCACCAATAAAAA
ACGCCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCGAGCTCGATATCAA
ATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAAT
CGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCA
AAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCTTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTTCACCGTAACACGCCA
CATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTA
ACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGAAATTCGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATA
AAGGCCGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTG
ACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCC
TGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCCGATCAACTCGAGTGCC
ACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTTTCAGATAAAAAAATCCTTAGCTTTC
GCTAAGGATGATTTCTGGAATTCCAGAAATCATCCTTAGCGATGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAATGGTT
TATTCTGCTCAATAGGTGTTTCAGTTCTTCATGATATTGAGGAGGAAGAGGAGAATATATGGAAGAACTGAAACACTTGGTCGACTCGACGGCAGCG
CAAAAGGCGGTGGTATCTACATCCGTGTTTCTACCCAGGAACAGGCGTCTGAAGGTCCTCTATCGAATCTCAGAAAAAAAACCTGGCGTCTTACT
GCGAAATCCAGGGTTGGGACGACTACCGTTTCTACATCGAAGAAGGTATCTCTGGTAAAAACACCAACCGTCCGAAACTGAAACTGCTGATGGAACA
CATCGAAAAAGGTAAAAATCAACATCCTGCTGGTTTACCGTCTGGACCGTCTGACCCGTCTGTTATCGACCTGCACAACTGCTGAACTTCCTGCAG
GAACACGGTTGCGCGTTCAAATCTGCGACCGAAACCTACGACACCACCACCGCGAACGGTCGTATGTCTATGGGTATCGTTTCTCTGCTGGCGCAGT
GGGAAACCGAAAACATGTCTGAACGTATCAAACTGAACCTGGAACACAAAGTTCTGGTTGAAGGTGAACGTGTTGGTGCGATCCCGTACGGTTTCGA

CCTGTCTGACGACGAAAACTGGTTAAAAACGAAAAATCTGCGATCCTGCTGGACATGGTTGAACGTGTTGAAAACGGTTGGTCTGTTAACCGTATC
 GTTAACCTACCTGAACCTGACCAACAACGACCGTAACCTGGTCTCCGAACGGTGTCTGCGTCTGCTGCGTAACCCGGCGCTGTACGGTGCACCCGTT
 GGAACGACAAAAATCGCGGAAAAACCCACGAAGGTATCATCTCTAAAGAACGTTTCAACCGTCTGCAGCAGATCCTGGCGGACCGTTCTATCCACCA
 CCGTCTGTGACGTAAAGGTACCTACATCTTCCAGGGTGTCTGCGTTGCCCGGTTTTCGACACGACCCCTGTCTGTTAACCGTTTTCATCAAAAAACGT
 AAAGACGGTACCGAATACTGCGGTGTCTGTACCGTTGCCAGCCGTGCATCAAACAGAACAAATACAACCTGGCGATCGGTGAAGCGCGTTTTCCTGA
 AAGCGCTGAACGAATACATGTCTACCGTTGAATTCCAGACCGTTGAAGACGAAGTTATCCCGAAAAAATCTGAACGTGAAATGCTGGAATCTCAGCT
 GCAGCAGATCGCGCGTAAACGTGAAAAATACCAGAAAGCGTGGGCGTCTGACCTGATGTCTGACGACGAATTCGAAAAACTGATGGTTGAAACCCGT
 GAAACCTACGACGAATGCAAACAGAACTGGAATCTTGCGAAGACCCGATCAAATCGACGAAACCTACCTGAAAGAAATCGTTTACATGTTCCACC
 AGACCTTCAACGACCTGGAATCTGAAAAACAGAAAGAATTCATCTCTAAATTCATCCGTACCATCCGTTACACCGTTAAAGAACAGCAGCCGATCCG
 TCCGGACAAATCTAAAACCGGTAAAGGTAAACAGAAAGTTATCATCACCGAAGTTGAATTCTACCAGTAAGCTTGATGGGGGATCCCATGGTACGCG
 TGCTAGAGGCATCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCTACTA
 GAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTCTGCGTTT-3'

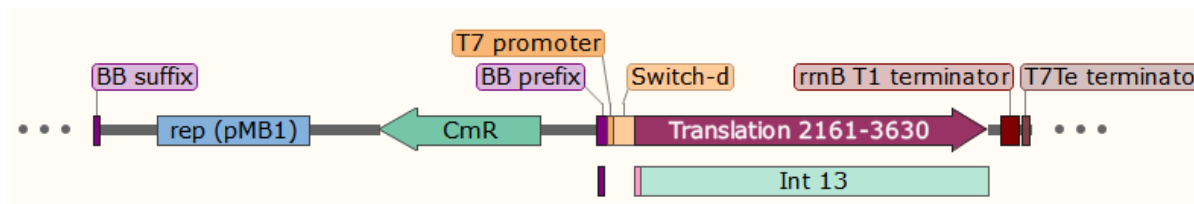


Figura A6. Mapa esquemático do primeiro plasmídeo construído para o subtipo N1 (*switch* N1-d). Representação gráfica dos principais elementos genéticos presentes no plasmídeo, incluindo a origem de replicação (rep pMB1), o marcador de resistência a cloranfenicol (CmR), o promotor T7, as regiões BB prefix e BB suffix, a sequência correspondente ao módulo do *switch* inserido na região de tradução (nt 2161-3630), o terminador *rrnB* T1 e o terminador T7. O esquema indica a organização e a orientação dos elementos no módulo de detecção.

Sequência da Figura A6. Sequência nucleotídica completa do primeiro plasmídeo construído para o subtipo N1 (*switch* N1-d). Sequência integral do constructo plasmidial representado na Figura A6, incluindo o *backbone* e o inserto correspondente ao módulo do *switch*. A sequência é apresentada no sentido 5'-3'.

5' - TATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAAAAGGGCAAGGTGTCACCACCCTGCCCTTTTTCTTTAAAACCGAAAAGATTACTTCGCGTTA
TGCAGGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGA
ATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCACAGGCTC
CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCT
CCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTG
TAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT
CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGG
TAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT
CCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA
TCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGCTCGAGGCTTGATTCTCACCAATAAAAAA
CGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCGAGCTCGATATCAAA
TTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAATC
GCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAA
AACTGGTGAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCAC
ATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTA
CAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGAAATTCGGGATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAA
AGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGA
CTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCT
GAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCCGATCAACTCGAGTGCCA

CCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTTTCAGATAAAAAAAATCCTTAGCTTTTCG
CTAAGGATGATTTCTGGAATTCCAGAAATCATCCTTAGCGATGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAATGGCAAC
TCAGCACCGTCTGGCCAAGACCAACCCACAGGTATGTATGAGAAGAGAGGAGATATGATGGTGGGTGGTCTTGGCCAGTCGACTCGACGGCAGCGC
AAAAGGCGGTTGGTATCTACATCCGTGTTTCTACCCAGGAACAGGCGTCTGAAGGTCACCTATCGAATCTCAGAAAAAAACTGGCGTCTTACTG
CGAAATCCAGGGTTGGGACGACTACCGTTTCTACATCGAAGAAGGTATCTCTGGTAAAAACACCAACCGTCCGAAACTGAACTGCTGATGGAACAC
ATCGAAAAAGGTAAAATCAACATCCTGCTGGTTTACCGTCTGGACCGTCTGACCCGTTCTGTTATCGACCTGCACAACTGCTGAACTTCCTGCAGG
AACACGGTTGCGCGTTCAAATCTGCGACCGAAACCTACGACACCACCACCGCGAACGGTCGTATGTCTATGGGTATCGTTTCTCTGCTGGCGCAGTG
GGAAACCGAAAAACATGTCTGAACGTATCAAACCTGAACCTGGAACACAAAGTTCTGGTTGAAGGTGAACGTGTTGGTGCGATCCCGTACGGTTTCGAC
CTGTCTGACGACGAAAACTGGTTAAAAACGAAAAATCTGCGATCCTGCTGGACATGGTTGAACGTGTTGAAAACGGTTGGTCTGTTAACCGTATCG
TTAACTACCTGAACCTGACCAACAACGACCGTAACTGGTCTCCGAACGGTGTTCTGCGTCTGCTGCGTAACCCGGCGCTGTACGGTGCGACCCGTTG
GAACGACAAAATCGCGGAAAACACCCACGAAGGTATCATCTCTAAAGAACGTTTCAACCGTCTGCAGCAGATCCTGGCGGACCGTTCTATCCACCAC
CGTCGTGACGTTAAAGGTACCTACATCTTCCAGGGTGTTCTGCGTTGCCCGGTTTTCGCGACCAGACCCTGTCTGTAAACCGTTTCATCAAAAAACGTA
AAGACGGTACCGAATACTGCGGTGTTCTGTACCGTTGCCAGCCGTGCATCAAACAGAACAAATACAACCTGGCGATCGGTGAAGCGCGTTTCCTGAA
AGCGCTGAACGAATACATGTCTACCGTTGAATTCCAGACCGTTGAAGACGAAGTTATCCCGAAAAATCTGAACGTGAAATGCTGGAATCTCAGCTG
CAGCAGATCGCGCGTAAACGTGAAAAATACCAGAAAGCGTGGGCGTCTGACCTGATGTCTGACGACGAATTCGAAAAACTGATGGTTGAAACCCGTG
AAACCTACGACGAATGCAAACAGAACTGGAATCTTGCGAAGACCCGATCAAAATCGACGAAACCTACCTGAAAGAAATCGTTTACATGTTCCACCA
GACCTTCAACGACCTGGAATCTGAAAAACAGAAAGAATTCATCTCTAAATTCATCCGTACCATCCGTTACACCGTTAAAGAACAGCAGCCGATCCGT
CCGGACAAATCTAAAACCGGTAAAGGTAAACAGAAAGTTATCATCACCGAAGTTGAATTCTACCAGTAAGCTTGATGGGGGATCCCATGGTACGCGT
GCTAGAGGCATCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCTACTAG
AGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTCTGCGTTT-3'

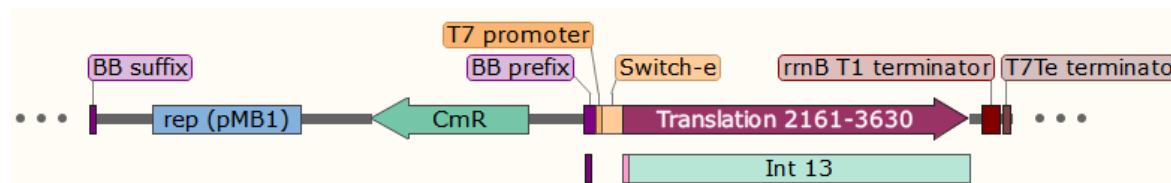


Figura A7. Mapa esquemático do segundo plasmídeo construído para o subtipo N1 (*switch* N1-e). Representação gráfica dos principais elementos genéticos presentes no plasmídeo, incluindo a origem de replicação (rep pMB1), o marcador de resistência a cloranfenicol (CmR), o promotor T7, as regiões BB prefix e BB suffix, a sequência correspondente ao módulo do *switch* inserido na região de tradução (nt 2161-3630), o terminador rrnB T1 e o terminador T7. O esquema indica a organização e a orientação dos elementos no módulo de detecção.

Sequência da Figura A7. Sequência nucleotídica completa do segundo plasmídeo construído para o subtipo N1 (*switch* N1-e). Sequência integral do constructo plasmidial representado na Figura A7, incluindo o *backbone* e o inserto correspondente ao módulo do *switch*. A sequência é apresentada no sentido 5'-3'.

5' -ATATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAAAAGGGCAAGGTGTCACCACCCTGCCCTTTTTCTTTAAACCGAAAAGATTACTTCGCGTT
 ATGCAGGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG
 AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTTGCTGGCGTTTTTCCACAGGCT
 CCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGC
 TCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT
 GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC
 TCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
 GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
 GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
 TCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAG
 ATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGCTCGAGGCTTGGATTCTCACCAATAAAAA
 ACGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCGAGCTCGATATCAA

ATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAAT
CGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCA
AAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCA
CATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTA
ACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTACCGTCTTTCATTGCCATACGAAATTCGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATA
AAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTG
ACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCC
TGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCCGATCAACTCGAGTGCC
ACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTTTCAGATAAAAAAAATCCTTAGCTTTC
GCTAAGGATGATTTCTGGAATTCCAGAAATCATCCTTAGCGATGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAATGGCAA
CTCAGCACCGTCTGGCCAAGACCAACCCACAGGTTATGAGGGAGAAAGAGGAGTAATGATGGTGGGTGGTCTTGGCCAGTCGACTCGACGGCAGCG
CAAAAGGCGGTTGGTATCTACATCCGTGTTTCTACCCAGGAACAGGCGTCTGAAGGTCACTCTATCGAATCTCAGAAAAAAAATGCGCTCTTACT
GCGAAATCCAGGGTTGGGACGACTACCGTTTCTACATCGAAGAAGGTATCTCTGGTAAAAACACCAACCGTCCGAAACTGAACTGCTGATGGAACA
CATCGAAAAAGGTAAAATCAACATCCTGCTGGTTTACCGTCTGGACCGTCTGACCCGTTCTGTTATCGACCTGCACAACTGCTGAACTTCCTGCAG
GAACACGGTTGCGCGTTCAAATCTGCGACCGAAACCTACGACACCACCACCGCGAACGGTTCGTATGTCTATGGGTATCGTTTCTCTGCTGGCGCAGT
GGGAAACCGAAAACATGTCTGAACGTATCAAACTGAACCTGGAACACAAAGTTCTGGTTGAAGGTGAACGTGTTGGTGCGATCCCGTACGGTTTCGA
CCTGTCTGACGACGAAAACTGGTTAAAAACGAAAAATCTGCGATCCTGCTGGACATGGTTGAACGTGTTGAAAACGGTTGGTCTGTTAACCGTATC
GTAACTACCTGAACCTGACCAACAACGACCGTAACTGGTCTCCGAACGGTGTTCTGCGTCTGCTGCGTAACCCGGCGCTGTACGGTGCGACCCGTT
GGAACGACAAAAATCGCGGAAAAACCCACGAAGGTATCATCTCTAAAGAACGTTTCAACCGTCTGCAGCAGATCCTGGCGGACCGTTCTATCCACCA
CCGTCTGTGACGTTAAAGGTACCTACATCTTCCAGGGTGTTCTGCGTTGCCCGGTTTGCGACCAGACCCTGTCTGTTAACCGTTTCATCAAAAAACGT
AAAGACGGTACCGAATACTGCGGTGTTCTGTACCGTTGCCAGCCGTGCATCAAACAGAACAAATACAACCTGGCGATCGGTGAAGCGCGTTTCCTGA
AAGCGCTGAACGAATACATGTCTACCGTTGAATTCCAGACCGTTGAAGACGAAGTTATCCCGAAAAATCTGAACGTGAAATGCTGGAATCTCAGCT

GCAGCAGATCGCGCGTAAACGTGAAAAATACCAGAAAGCGTGGGCGTCTGACCTGATGTCTGACGACGAATTCGAAAAACTGATGGTTGAAACCCGT
GAAACCTACGACGAATGCAAACAGAACTGGAATCTTGCGAAGACCCGATCAAAATCGACGAAACCTACCTGAAAGAAATCGTTTACATGTTCCACC
AGACCTTCAACGACCTGGAATCTGAAAAACAGAAAGAATTCATCTCTAAATTCATCCGTACCATCCGTTACACCGTTAAAGAACAGCAGCCGATCCG
TCCGGACAAATCTAAAACCGGTAAAGGTAAACAGAAAGTTATCATCACCAGAGTTGAATTCTACCAGTAAGCTTGATGGGGGATCCCATGGTACGCG
TGCTAGAGGCATCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCTACTA
GAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTCTGCGTTT-3'

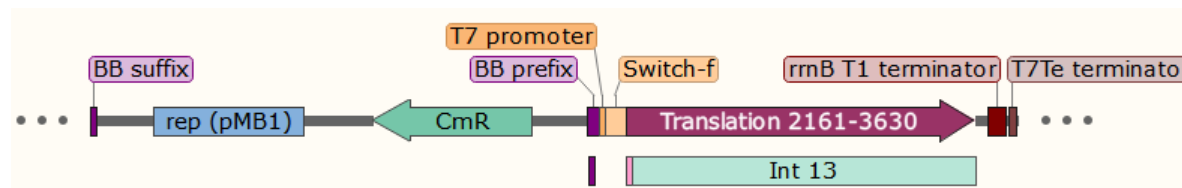


Figura A8. Mapa esquemático do terceiro plasmídeo construído para o subtipo N1 (*switch* N1-f). Representação gráfica dos principais elementos genéticos presentes no plasmídeo, incluindo a origem de replicação (rep pMB1), o marcador de resistência a cloranfenicol (CmR), o promotor T7, as regiões BB prefix e BB suffix, a sequência correspondente ao módulo do *switch* inserido na região de tradução (nt 2161-3630), o terminador rrnB T1 e o terminador T7. O esquema indica a organização e a orientação dos elementos no módulo de detecção.

Sequência da Figura A8. Sequência nucleotídica completa do terceiro plasmídeo construído para o subtipo N1 (*switch* N1-f). Sequência integral do constructo plasmidial representado na Figura A8, incluindo o *backbone* e o inserto correspondente ao módulo do *switch*. A sequência é apresentada no sentido 5'-3'.

5' -ATATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAAAAGGGCAAGGTGTCACCACCCTGCCCTTTTTCTTTAAACCGAAAAGATTACTTCGCGTT
ATGCAGGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG
AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCACAGGCT
CCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGC
TCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCT

GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTA
TCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAG
ATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGCTCGAGGCTTGGATTCTCACCAATAAAAA
ACGCCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCGAGCTCGATATCAA
ATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAAT
CGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCA
AAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCA
CATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTA
ACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTACCGTCTTTTATTGCCATACGAAATTCGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATA
AAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTG
ACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCC
TGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCCCGATCAACTCGAGTGCC
ACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTTTCAGATAAAAAAATCCTTAGCTTTC
GCTAAGGATGATTTCTGGAATTCCAGAAATCATCCTTAGCGATGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAATGGCAA
CTCAGCACCGTCTGGCCAAGACCAACCCACAGGATGTAAGAGAGAGAGAGGAGTAATGATGGTGGGTGGTCTTGGCCAGTCGACTCGACGGCAGCG
CAAAAGGCGGTTGGTATCTACATCCGTGTTTCTACCCAGGAACAGGCGTCTGAAGGTCACTCTATCGAATCTCAGAAAAAAAACCTGGCGTCTTACT
GCGAAATCCAGGGTTGGGACGACTACCGTTTCTACATCGAAGAAGGTATCTCTGGTAAAAACACCAACCGTCCGAAACTGAACTGCTGATGGAACA
CATCGAAAAAGGTAAAATCAACATCCTGCTGGTTTACCGTCTGGACCGTCTGACCCGTTCTGTTATCGACCTGCACAACTGCTGAACTTCCTGCAG
GAACACGGTTGCGCGTTCAAATCTGCGACCGAAACCTACGACACCACCACCGCGAACGGTCGTATGTCTATGGGTATCGTTTCTCTGCTGGCGCAGT

GGGAAACCGAAAACATGTCTGAACGTATCAAACCTGAACCTGGAACACAAAGTTCTGGTTGAAGGTGAACGTGTTGGTGCATCCCGTACGGTTTCGA
CCTGTCTGACGACGAAAACTGGTTAAAAACGAAAAATCTGCGATCCTGCTGGACATGGTTGAACGTGTTGAAAACGGTTGGTCTGTTAACCGTATC
GTTAACTACCTGAACCTGACCAACAACGACCGTAACTGGTCTCCGAACGGTGTTCTGCGTCTGCTGCGTAACCCGGCGCTGTACGGTGCACCCGTT
GGAACGACAAAATCGCGGAAAACACCCACGAAGGTATCATCTCTAAAGAACGTTTCAACCGTCTGCAGCAGATCCTGGCGGACCGTTCTATCCACCA
CCGTCGTGACGTAAAGGTACCTACATCTTCCAGGGTGTTCTGCGTTGCCCGGTTTTCGACACCAGACCCGTGTCTGTTAACCGTTTCATCAAAAAACGT
AAAGACGGTACCGAATACTGCGGTGTTCTGTACCGTTGCCAGCCGTGCATCAAACAGAACAAATACAACCTGGCGATCGGTGAAGCGCGTTTCCTGA
AAGCGCTGAACGAATACATGTCTACCGTTGAATTCCAGACCGTTGAAGACGAAGTTATCCCGAAAAATCTGAACGTGAAATGCTGGAATCTCAGCT
GCAGCAGATCGCGCGTAAACGTGAAAAATACCAGAAAGCGTGGGCGTCTGACCTGATGTCTGACGACGAATTCGAAAAACTGATGGTTGAAACCCGT
GAAACCTACGACGAATGCAAACAGAACTGGAATCTTGCGAAGACCCGATCAAAATCGACGAAACCTACCTGAAAGAAATCGTTTACATGTTCCACC
AGACCTTCAACGACCTGGAATCTGAAAAACAGAAAGAATTCATCTCTAAATTCATCCGTACCATCCGTTACACCGTTAAAGAACAGCAGCCGATCCG
TCCGGACAAATCTAAAACCGGTAAAGGTAAACAGAAAGTTATCATCACCGAAGTTGAATTCTACCAGTAAGCTTGATGGGGGATCCCATGGTACGCG
TGCTAGAGGCATCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCTACTA
GAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTCTGCGTTT-3'

Abaixo encontra-se a representação do módulo de resposta referente ao plasmídeo que contém a *luciferase* como gene repórter:

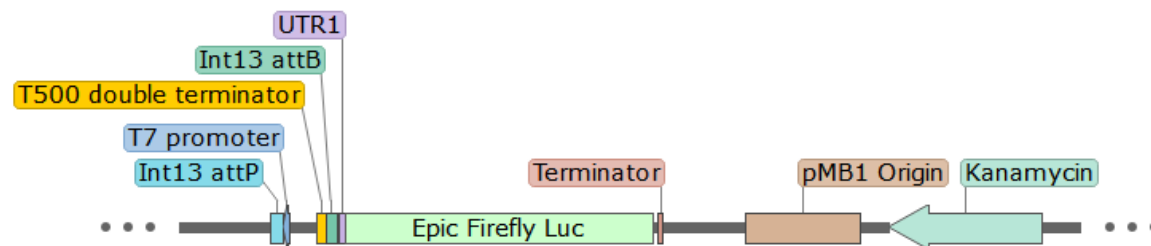


Figura A9. Mapa esquemático do plasmídeo construído para a leitura da luciferase. Representação gráfica dos principais elementos genéticos do plasmídeo, incluindo os sítios de recombinação Int13 *attB* e *attP*, a região UTR1, o promotor T7, o terminador T500 duplo, o gene repórter *luciferase*, o terminador transcricional, a origem de replicação pMB1 e o marcador de resistência à canamicina. O esquema indica a organização e orientação dos elementos no módulo de resposta.

Sequência da Figura A9. Sequência nucleotídica completa do plasmídeo construído para a leitura da luciferase. Sequência integral do constructo plasmidial representado na Figura A9, incluindo o *backbone* e o inserto correspondente ao gene repórter *luciferase*. A sequência é apresentada no sentido 5'-3'.

5' –TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACA
AGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCAAATGCGG
TGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG
CCTCATCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAC
GACGGCCAGTGCAACGCGATGACGATGGATAGCGATTTCATCGATGAGCTGACCCGATCGCCGCCGCGGAGGGTTGCGTTTGAGACGGGCGACAGAT
TCTAGAGTATTCGGAGTTGTATTTATGTTACTAAAACAACTGGTCAAGTTCTACAAATACAACCGTTATTGTCTGGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTA
TTAATTTCTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAA
TACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCTTATCGAAATTTAAAGAAAAAGGGCAGGGTGGTGACACCTTGCCCT

TTTTTGCCGGAGCATACATTGTTGTTGTTTTTCCAGATCCAGTTGGTCCTGTAAATATAAGCAATCCATGTGAGTCTGCAGAATAATTTTGTTTAAC
TTTAAGAAGGAGATATAATGGAGGACGCGAAAAACATCAAGAAAGGCCAGCACCGTTCTATCCGCTGGAAGATGGTACCGCCGGTGAACAATTGCA
CAAAGCGATGAAACGTTATGCGCTGGTTCGGGTACCATCGCATTCACGGACGCGCATATCGAGGTTAACATCACCTATGCCGAGTACTTCGAGATG
AGCGTTCGTCTGGCCGAGGCAATGAAGCGTTATGGTTTGAATACCAATCATCGCATCGTCGTCTGTAGCGAGAACAGCTTGCAGTTTTTCATGCCAG
TTCTGGGTGCACTGTTTTATTGGTGTGGCAGTGGCGCCTGCGAATGATATCTACAACGAGCGTGAAGTGTGAATAGCATGAACATTTTCGAGCCGAC
GGTGGTCTTTGTGTCCAAGAAAGGTTTGCAGAAGATTCTGAATGTGCAAAGAAGTTGCCGATCATTAGAAAATCATCATCATGGACAGCAAGACC
GATTACCAGGGTTTCCAAAGCATGTACACTTTTGTGACGAGCCACCTGCCTCCGGGTTTTAACGAGTATGATTTTCGTTCCGGAAAGCTTCGACCGTG
ATAAGACGATTGCACTGATTATGAACTCGTCCGGCTCTACCGGCCTGCCTAAAGGCGTGGCCCTGCCGCACCGTACTGCATGTGTCCGCTTCAGCCA
CGCGCGTGATCCGATCTTCGGTAACCAAATCATTCGGACACCGCCATTTTGTCTGTCTGTTCCGTTTCATCATGGCTTTGGTATGTTTACCACTCTG
GGTTACCTGATCTGTGGTTTCCGTGTTGTTCTGATGTACCGTTTCGAAGAAGAACTGTTCCCTGCGTAGCCTGCAAGATTACAAGATCCAATCCGCGC
TGCTGGTGCCGACGCTGTTTAGCTTCTTCGCTAAATCCACCCTGATTGACAAATATGACTTGAGCAACCTGCACGAAATCGCGTCGGGCGGTGCGCC
GCTGAGCAAAGAAGTCGGTGAGGCCGTTGCGAAACGTTTCCATCTGCCGGGCATCCGTCAGGGTTATGGCCTGACGGAAACGACCAGCGCGATTTTG
ATTACCCCTGAGGGTGACGATAAACCGGGTGCCGTTGGCAAGGTGGTACCGTTCTTTGAGGCTAAAGTCGTGGACCTGGACACGGGTAAGACTCTGG
GTGTGAATCAACGTGGCGAGTTGTGCGTTCGTGGCCCGATGATCATGAGCGGTTATGTCAACAACCCGGAAGCAACTAATGCGTTGATCGATAAGGA
TGGCTGGCTGCACAGCGGCGACCTGGCGTACTGGGATGAGGATGAACACTTTTTTCATCGTTGGTTCGCCTGAAGAGCCTGATCAAGTACAAGGGCTAC
CAGGTGGCACCGGCTGAACTGGAGAGCATTCTGTTGCAACACCCTAATATCTTCGACGCGGGTGTTCGGGTCTGCCTGATGATGATGCCGGTGAAT
TGCCAGCTGCGGTGGTCGTTCTGGAACACGGTAAAACGATGACTGAAAAAGAAATCGTGGACTACGTCGCCTCGCAGGTGACCACCGCTAAAAAGTT
GCGTGGTGGCGTGGTGTGTTGTGGATGAAGTGCCGAAAGGCCTGACGGGTAAACGTGATGCACGTAAGATTCGTGAGATCTTGATCAAGGCGAAGAAA
GGTGGTAAATCCAAGTTGTAATAACGCTGATAGTGTAGATCGCTACCAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTGTACTAGTATCAGTTCTGGACCA
GCGAGCTGTGCTGCGACTCGTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGA
AGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGT
GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT

CGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAA
GTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGTCGCTTAC
CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAG
CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGC
CACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGC
GGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGA
ACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTA
AAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAGTGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATAT
TTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTC
CAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAA
GAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCACCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGAT
TGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCCGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAA
CAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCTGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACG
GATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGCCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCA
TGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCAT
ATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCTTCAAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCT
CGATAACTCAAAAATACGCCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCACACATTTCCCCGAAAAGTGCC
ACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC-3'

APÊNDICE B - DADOS BRUTOS DOS ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Tabela B1. Dados brutos de luminescência da triagem dos *switches* H5-a, H5-b e H5-c em função da concentração de RNA sintético (Figura 10). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos para diferentes quantidades totais de DNA plasmidial (25 ng para H5-a e H5-b; 12 ng para H5-c) e proporções entre os módulos de detecção e resposta (1:5 para H5-a; 2:5 para H5-b; 2:1 para H5-c), nas concentrações de RNA sintético de 0 a 2000 nM. Ajuste: valores calculados após subtração do sinal do controle negativo (0 nM) correspondente ao mesmo ensaio. Valores negativos resultantes dessa correção foram substituídos por zero, por apresentarem ausência de sinal detectável acima do controle.

Concentração RNA	<i>switch-a</i> (H5)	Correção	AJUSTE	<i>switch-b</i> (H5)	Correção	AJUSTE	<i>switch-c</i> (H5)	Correção	AJUSTE
0 nM	115096			37493			29488		
0,2 nM	113016	-2080	0	45022	7529	7529	28525	-963	0
2 nM	57340	-57756	0	41019	3526	3526	33152	3664	3664
20 nM	98329	-16767	0	88973	51480	51480	27289	-2199	0
200 nM	24631	-90465	0	23011	-14482	0	59045	29557	29557
2000 nM	29266	-85830	0	27784	-9709	0	24081	-5407	0
DNA total (ng)	25 ng			25 ng			12 ng		
Proporção	1:5			2:5			2:1		

Tabela B2. Dados brutos de luminescência da triagem dos *switches* N1-d, N1-e e N1-f em função da concentração de RNA sintético (Figura 11). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos para 16 ng de DNA plasmidial total e diferentes proporções entre os módulos de detecção e resposta (2:1 para N1-d; 1:2 para N1-e; 1:5 para N1-f), nas concentrações de RNA sintético de 0 a 2000 nM. Ajuste: valores calculados após subtração do sinal do controle negativo (0 nM) correspondente ao mesmo ensaio. Valores negativos resultantes dessa correção foram substituídos por zero, por apresentarem ausência de sinal detectável acima do controle.

Concentração RNA	<i>switch-d</i> (N1)	Correção	AJUSTE	<i>switch-e</i> (N1)	Correção	AJUSTE	<i>switch-f</i> (N1)	Correção	AJUSTE
0 nM	191731			2022845			15112		
0,2 nM	287717	95986	95986	2324215	301370	301370	34742	19630	19630

2 nM	139767	-51964	0	454529	-1568316	0	228286	213174	213174
20 nM	22872	-168859	0	88716	-1934129	0	134362	119250	119250
200 nM	1755	-189976	0	9830	-2013015	0	131192	116080	116080
2000 nM	699	-191032	0	44998	-1977847	0	254561	239449	239449
DNA total (ng)	16 ng			16 ng			16 ng		
Proporção	2:1			1:2			1:5		

Tabela B3. Dados brutos de luminescência do ensaio de refinamento das condições de DNA para o *switch* H5-b em função da concentração de RNA sintético (Figura 12). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos para diferentes quantidades totais de DNA plasmidial (30, 60 e 72 ng) e proporções entre os módulos de detecção e resposta (2:5 e 1:3), na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo.

<i>switch</i> -b (H5)	Concentração de RNA (nM)	
	0 nM	20 nM
30 ng (2:5)	4756	5140
60 ng (1:3)	13323	20740
72 ng (1:3)	14256	12374

Tabela B4. Dados brutos de luminescência do ensaio de refinamento das condições de DNA para o *switch* N1-f em 0 e 20 nM de RNA sintético (Figura 13). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos para diferentes quantidades totais de DNA plasmidial (16 e 32 ng) e proporções entre os módulos de detecção e resposta (1:5 e 2:1), na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo.

<i>switch</i> -f (N1)	Concentração de RNA (nM)	
	0 nM	20 nM
16 ng (1:5)	15112	134362
16 ng (2:1)	75997	78668
32 ng (2:1)	10015	77959

Tabela B5. Dados brutos de luminescência do ensaio de prova de conceito do *switch* H5-b em diferentes concentrações de RNA sintético (Figura 14). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos em três réplicas biológicas independentes, utilizando 45,5 ng de DNA plasmidial total e proporção 1:3 entre os módulos de detecção e resposta, na ausência (0 nM) e na presença de 0,2-2000 nM de RNA sintético alvo. Ajuste: valores calculados após subtração do sinal médio do controle negativo (0 nM) correspondente ao mesmo ensaio. Valores negativos resultantes dessa correção foram substituídos por zero, por apresentarem ausência de sinal detectável acima do controle.

RNA (nM)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA DIA 1	DP DIA 1	CORREÇÃO	AJUSTE
0 nM	500	520	500	507	12		
0,2 nM	960	960	1020	980	35	473	473
2 nM	1370	1440	1410	1407	35	900	900
20 nM	1840	1830	1790	1820	26	1313	1313
200 nM	14330	14300	13990	14207	188	13700	13700
2000 nM	11600	11590	11140	11443	263	10937	10937
RNA (nM)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA DIA 2	DP DIA 2	CORREÇÃO	AJUSTE
0 nM	2203	2104	2004	2104	100		
0,2 nM	3467	3539	3464	3490	42	1386	1386
2 nM	4539	4237	4096	4291	226	2187	2187
20 nM	3968	3623	3731	3774	176	1670	1670
200 nM	4932	4661	4497	4697	220	2593	2593
2000 nM	3245	3188	3008	3147	124	1043	1043
RNA (nM)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA DIA 3	DP DIA 3	CORREÇÃO	AJUSTE
0 nM	8195	7998	7832	8008	182		
0,2 nM	8919	8293	8217	8476	385	468	468
2 nM	9051	8449	8549	8683	323	675	675

20 nM	9205	9116	9096	9139	58	1131	1131
200 nM	7837	7089	6307	7078	765	-931	0
2000 nM	3318	2957	2999	3091	197	-4917	0

Tabela B6. Dados brutos de luminescência do ensaio de prova de conceito do *switch* N1-f em diferentes concentrações de RNA sintético (Figura 15). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos em três réplicas biológicas independentes, utilizando 33 ng de DNA plasmidial total e proporção 2:1 entre os módulos de detecção e resposta, na ausência (0 nM) e na presença de 0,2-2000 nM de RNA sintético alvo. Ajuste: valores calculados após subtração do sinal médio do controle negativo (0 nM) correspondente ao mesmo ensaio. Valores negativos resultantes dessa correção foram substituídos por zero, por apresentarem ausência de sinal detectável acima do controle.

RNA (nM)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA DIA 1	DP DIA 1	CORREÇÃO	AJUSTE
0 nM	792	777	745	771	24		
0,2 nM	1393	1640	1660	1564	149	793	793
2 nM	4861	4654	4025	4513	435	3742	3742
20 nM	5723	5242	5121	5362	318	4591	4591
200 nM	4514	4742	4709	4655	123	3884	3884
2000 nM	2853	2833	2743	2810	59	2038	2038
RNA (nM)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA DIA 2	DP DIA 2	CORREÇÃO	AJUSTE
0 nM	2279	2158	2084	2174	98		
0,2 nM	2695	2738	2723	2719	22	545	545
2 nM	3569	3262	3251	3361	181	1187	1187
20 nM	6371	6047	6087	6168	177	3995	3995
200 nM	14448	14496	13281	14075	688	11901	11901
2000 nM	3233	2998	2952	3061	151	887	887

RNA (nM)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA DIA 2	DP DIA 2	CORREÇÃO	AJUSTE
0 nM	9986	9571	9520	9692	256		
0,2 nM	4926	4720	4943	4863	124	-4829	0
2 nM	3096	2900	2841	2946	133	-6747	0
20 nM	2501	2318	2332	2384	102	-7309	0
200 nM	2590	2504	2464	2519	64	-7173	0
2000 nM	592	596	591	593	3	-9099	0

Tabela B7. Valores de luminescência do controle negativo (0 nM de RNA) para os *switches* H5-b e N1-f nas três réplicas biológicas (Figura 16). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos na ausência de RNA sintético alvo, em três ensaios biológicos independentes (RB1-RB3). Para o *switch* H5-b, foram utilizados 45,5 ng de DNA plasmidial total na proporção 1:3 entre os módulos de detecção e resposta; para o *switch* N1-f, 33 ng de DNA total na proporção 2:1. As colunas de média correspondem à média das réplicas técnicas de cada ensaio biológico.

RNA 0 (nM)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA	RB
switches H5-b	500	520	500	507	1
	2203	2104	2004	2104	2
	8195	7998	7832	8008	3
RNA 0 (nM)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA	RB
switches N1-f	792	777	745	771	1
	2279	2158	2084	2174	2
	9986	9571	9520	9692	3

Tabela B8. Dados brutos de luminescência do ensaio pontual de avaliação do novo protocolo para o *switch* N1-f em 0 e 20 nM de RNA sintético (Figura 17). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos em três réplicas técnicas para cada combinação de quantidade total de DNA plasmidial e proporção entre os módulos de detecção e resposta: 60 ng (1:5), 20 ng (1:1), 70 ng (2:5) e 120 ng (1:5), na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo. As colunas de média e desvio padrão (DP) correspondem, respectivamente, à média e à dispersão das três réplicas técnicas de cada condição.

60 ng (1:5)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA	DP
0 nM	100	110	110	107	5,77
20 nM	230	240	230	233	5,77
20 ng (1:1)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA	DP
0 nM	2870	2950	2940	2920	43,59
20 nM	3270	3490	3550	3437	147,42
70 ng (2:5)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA	DP
0 nM	600	570	570	580	17,32
20 nM	370	390	320	360	36,06
120 ng (1:5)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA	DP
0 nM	130	140	120	130	10,00
20 nM	80	90	80	83	5,77

Tabela B9. Dados brutos de luminescência do ensaio pontual nas condições otimizadas de DNA para o *switch* N1-f em 0 e 20 nM de RNA sintético (Figura 18). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos em três réplicas técnicas, utilizando 33 ng de DNA plasmidial total na proporção 2:1 entre os módulos de detecção e resposta, na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo. As colunas de média e desvio padrão (DP) correspondem, respectivamente, à média e à dispersão das três réplicas técnicas de cada condição.

33 ng (2:1)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA	DP
0 nM	400	420	410	410	10,00
20 nM	9270	9040	9040	9117	132,79

Tabela B10. Dados brutos de luminescência da tentativa de réplica nas condições otimizadas de DNA para o *switch* N1-f em 0 e 20 nM de RNA sintético (Figura 19). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos em três réplicas técnicas, utilizando 33 ng de DNA plasmidial total na proporção 2:1 entre os módulos de detecção e resposta, na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo, sob o novo protocolo experimental. As colunas de média e desvio padrão (DP) correspondem, respectivamente, à média e à dispersão das três réplicas técnicas de cada condição.

33 ng (2:1)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA	DP
0 nM	1200	1120	1140	1153	41,63
20 nM	1200	1140	1100	1147	50,33

Tabela B11. Dados brutos de luminescência do ensaio do *switch* N1-f com adição de inibidor de RNase, nas condições de 0 e 20 nM de RNA sintético (Figura 20). Valores absolutos de luminescência (RLU) obtidos em três réplicas técnicas por condição, utilizando 33 ng de DNA plasmidial total na proporção 2:1 entre os módulos de detecção e resposta, na ausência (0 nM) e na presença (20 nM) de RNA sintético alvo, sob o novo protocolo experimental com adição de inibidor de RNase. As colunas de média e desvio padrão (DP) correspondem, respectivamente, à média e à dispersão das três réplicas técnicas de cada condição. Dados referentes a um ensaio biológico.

33 ng (2:1)	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MÉDIA	DP
0 nM	650	620	640	637	15,28
20 nM	2670	2820	2880	2790	108,17

Tabela B12. Dados de *Fold Change* dos sensores H5-b e N1-f nas réplicas R1-R3 com 200 nM de RNA sintético alvo (Figura 22). Valores de *Fold Change* calculados como a razão entre a luminescência obtida na presença (200 nM) e na ausência de RNA sintético alvo, para os sensores H5-b e N1-f, ao longo de três réplicas sequenciais (R1, R2 e R3). Os dados evidenciam redução progressiva da resposta para H5-b entre R1 e R2 e estabilidade relativa para N1-f até R2, seguida de colapso funcional de ambos em R3. Valores apresentados correspondem a um ensaio biológico.

Réplicas	H5-b Razão	N1-f Razão
R1	28,02	6,04
R2	2,23	6,47
R3	0,88	0,26

9. ANEXOS - *SCRIPT NUPACK* (Franco *et al.*, 2023)

Material = RNA

Temperature = 37 ou 30

Trials = 10 a 20

→ Model Options

Parameters = rna95

Ensemble = All stacking

Salts = Na + 1M

Mg ++ = 0M

→ Algorithm settings

Stop condition = 0.05 Max

design time = 2h Random

seed = 0 integer

Wobble mutations = Allow

Target Tubes

Domains:

domain a = N40 (o reverso complementar da sequência escolhida após o

alinhamento) domain b = N6

domain c = N3VVVVVAGAGGAGWWWN2AUG (23 nucleotídeos da região
RBS com códon inicial)

domain d = N18

a is the reverse complement of the trigger

domain c = RBS + codon initial

RBS may be exchanged by a sequence of purines RRRRRRR

Strands:

switch = a,b,c,d

Trigger = a*

Detect = a*,a,b,c,d

Target complexes:

Target complex - Strand order - Target structure

switch_structure - switch - U20D18(U3D5U15U3)

Trigger_struture - Trigger - U40

Detect_structure - Trigger, switch - D40+U47

Target Tube:

Tube 1

On-target complex - Target conc

switch_structure - 10 uM

Trigger_structure - 10 uM

Off-target = não preenchido

Tube 2

On-target complex - Target conc

Detect_structure - 10 uM

Off-target = não preenchido

→ Hard Constraints

Pattern constraints

Pattern set: AAAA, CCCC, GGGG, UUUU

Scope: Global

→ Defect Weights