

**ANDRÉ SILVA DE OLIVEIRA**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO DOMÍNIO III DA PROTEÍNA DE ENVELOPE (E)  
DO VÍRUS DENGUE-1 E 2 EM *Pichia pastoris***

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL**

**2011**

**ANDRÉ SILVA DE OLIVEIRA**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO DOMÍNIO III DA PROTEÍNA DE ENVELOPE (E)  
DO VÍRUS DENGUE-1 E 2 EM *Pichia pastoris***

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.**

APROVADA: 08 de junho de 2011.

---

Prof.: Cynthia Canedo Silva

---

Prof.: Eduardo Resende Honda

---

Prof.: Sérgio Oliveira de Paula  
(Orientador)

***Dedicado a Deus,  
detentor da patente de todas as biomoléculas!***

***Aiô***

***(Israel tentando atender o celular)***

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, que são as pessoas que mais me promoveram na vida e com as quais posso sempre contar. Meus familiares, como meu padrinho Tônico e a Tia Vanny que me acompanham e sempre incentivaram meus estudos. A Super Vovó Jedida, pela dedicação e carinho, ela, com quase 100 anos encontrou no livro de farmacologia o remédio que usa para regular sua pressão.

À família que tenho construído, minha querida e amada esposa que é incrível em tudo, me apoiou e ajudou sempre! Somos sim, o braço direito um do outro. Meu filhote Israelzinho que nasceu entre seminários, provas, noitadas no lab e ao seu modo, também tem ajudado muito. Tive medo de que ele falasse “PCR” antes de papai.

Meu orientador Sérgio que me oportunizou, ajudou na peleja, e incentivou: “senta o pau zê”, “clona o peptídeo aí” (tenho que confessar que alterei a configuração do ar condicionado da biomol, só uma vez).

À equipe de trabalho: Alípio (parceirão), Flavinha, Samara, Eliziária (Elaziária, DNaria, Escravizária, Helpária, Babeziária), Vinícius e Marcela, aos quais realmente devo muitas coxinhas de catupiry e sem os quais o trabalho seria no mínimo muito menos divertido.

À todos os amigos do lab e aos professores, Leandro e Eduardo, pelo apoio. À Cyntia que nos levou um saco cheio de toberone e à Silvia que fez um bolo gostoso de banana na mudança da *batcaverna* para o *new lab* e me prestou grande contribuição na etapa final do trabalho. Ao Eduardo Honda, por ter enviado os plasmídios e as cepas de *Pichia*.

Ao Jhony Potência (conselheiro mór) e ao Camilo e à Marilane que facilitaram minha vida em Viçosa. Optei pela UFV e pelo laboratório de imunovirologia sem muito contato prévio, mas da minha parte, certamente foi uma escolha muito feliz.

À FAPEMIG que financiou o projeto e ao IFNMG.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>1.1 O Vírus Dengue</b>	<b>01</b>
1.1.1 A família Flaviviridae	01
1.1.2 Epidemiologia	01
1.1.3 Manifestações Clínicas	03
1.1.4 Sorotipos e Estruturas	04
<b>1.2 Diagnóstico e Expressão Heteróloga</b>	<b>08</b>
1.2.1 Diagnóstico	08
1.2.2 Sistema de Expressão Heteróloga em <i>Pichia pastoris</i>	10
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1 Estoques Virais	13
3.2 Plasmídios	13
3.3 Cepas de <i>P. pastoris</i> (PichiaPink™ System) utilizadas	14
3.4 Extração do RNA Viral	14
3.5 Confecção do DNA Viral	15
3.6 Primers e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	15
3.8 Preparação de Bactérias competentes para a transformação	17
3.9 Clonagem do domínio III da proteína E no plasmídeo de clonagem pGEM-T easy	17
3.10 Transformação de células competentes DH5α com o vetor de clonagem	18
3.11 Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas com o vetor de clonagem	18
3.12 Ensaio de Restrição	19
3.13 Transformação de células competentes DH5α com o vetor de expressão	20
3.14 Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas	

com o vetor de expressão	20
3.15 Ensaio de Restrição	21
3.16 Transformação em <i>Pichia pastoris</i> (PichiaPink™ System)	21
3.17 Análise do DNA extraído das colônias de <i>Pichia pastoris</i> (PichiaPink™ System) transformadas com o vetor de expressão	22
3.18 Expressão da proteína E	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Extração de RNA, Síntese de cDNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	24
4.2 Clonagem do gene do domínio III da proteína E em vetor pGEM-T easy	24
4.3 Digestão do plasmídeo pGEM-T easy/DIII	25
4.4 Extração do plasmídeo pPINK-LC	26
4.5 Digestão do plasmídeo pPINK-LC	27
4.6 Análise e Seleção das colônias transformadas	27
4.7 Detecção da transformação de <i>Pichia pastoris</i> : Extração de DNA e PCR	28
4.8 Expressão da proteína E do vírus dengue-1	28
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35

## RESUMO

OLIVEIRA, André Silva, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho, 2011.  
**Expressão heteróloga do domínio III da proteína de envelope (E) do vírus dengue-1 e 2 em *Pichia pastoris*.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

Anualmente os vírus dengue (DENV) são responsáveis por 100 milhões de infecções em todo o mundo. O vírus apresenta quatro sorotipos diferentes, DENV-1, 2, 3 e 4, e é constituído por três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não-estruturais. A proteína de envelope (E) é responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira, sendo composta por três domínios (I, II e III), onde destaca-se o domínio III (DIII) por apresentar conformação “imunoglobulina-like”, sendo considerado o componente mais imunoestimulador. O diagnóstico definitivo da infecção pelos vírus dengue pode ser feito somente no laboratório e depende do isolamento desses vírus, detecção de antígenos virais ou RNA em soro ou tecidos, ou detecção de anticorpos específicos no soro dos pacientes. Esse processo é demorado, o que dificulta a intervenção clínica e epidemiológica. Os kits de diagnóstico rápido e barato resolveriam esta questão, porém o maior entrave para a sua produção tem sido a obtenção de proteínas com função imunoestimulatória em quantidade e qualidade. Neste trabalho, usamos um sistema de expressão heteróloga para a produção do domínio III da proteína de envelope (E) do vírus dengue-1 e 2 como antígeno recombinante. . A levedura *Pichia pastoris* foi adotada para a expressão deste domínio proteico por apresentar um padrão de modificações pós-traducionais semelhante a de mamíferos. Em nossos resultados, testes moleculares confirmaram a integração do gene do DIII da proteína E ao genoma da levedura. Os testes preliminares quanto a expressão mostraram resultados animadores evidenciando que a expressão heteróloga em *Pichia pastoris* é promissora quanto a produção de antígenos de interesse biotecnológico.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, André Silva, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, June, 2011. **Heterologous expression of domain III of the envelope (E) protein of dengue virus-1 and 2 in *Pichia pastoris***. Adviser: Sérgio Oliveira de Paula

Annually, the dengue virus (DENV) are responsible for 100 million infections worldwide. The virus has four distinct serotypes, DENV-1, 2, 3 and 4, and consists of three structural proteins (C, prM and E) and seven non-structural. The envelope protein (E) is responsible for binding the virus to the host cell, consisting of three domains (I, II and III), where stands the domain III (DIII) because it presents "immunoglobulin-like" conformation, and it is considered the most immunostimulatory component. The definitive diagnosis of infection by dengue virus can only be done in the laboratory and depends of the isolation of these viruses, detection of viral antigens or RNA in serum or tissue, or detection of specific antibodies in the serum of patients. This process is time consuming, which hinders the epidemiological and clinical intervention. The rapid and cheap diagnostic kits is the solution for this, but the biggest obstacle to its production has been getting immunostimulating proteins in quantity and quality. In this work, we used a heterologous expression system for the production of domain III of envelope protein (E) of dengue virus 1 and 2. The yeast *Pichia pastoris* has been adopted for the expression of this protein domain because it presenting a pattern of post-translational modifications similar to that of mammals. In our results, molecular tests confirmed the integration of the DIII protein gene in the yeast genome. Preliminary tests about the expression presented encouraging results, it showing that the heterologous expression in *Pichia pastoris* is promising as the production of antigens of biotechnological interest.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O Vírus Dengue

### 1.1.1 A família Flaviridae

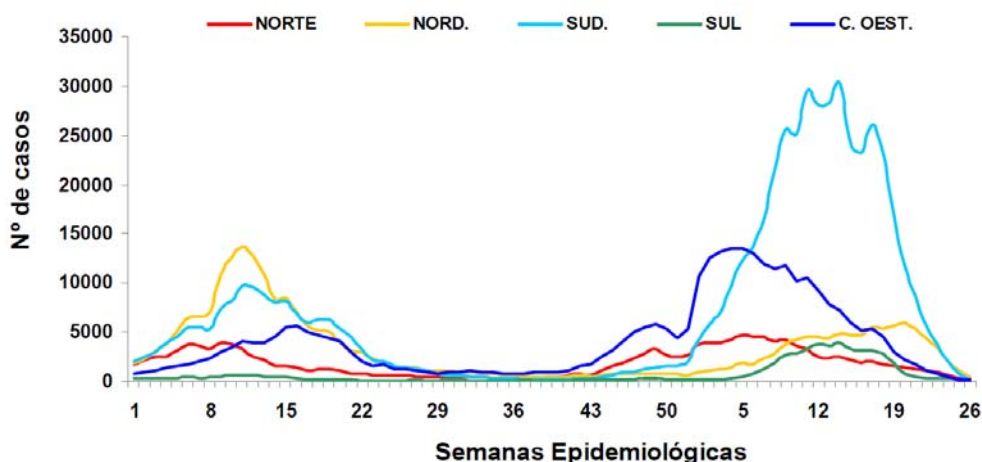
A família Flaviviridae possui, entre os seus componentes, vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus) de grande importância médica para a Saúde Pública. Em particular, as infecções causadas pelos vírus da dengue são as que assumem maior importância no nosso país (FRANCKLET *et al.*, 1991). O vírus da dengue possui 4 sorotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DENV-4 e a imunidade adquirida após infecção com cada um dos sorotipos é duradoura (DE PAULA E FONSECA, 2004).

### 1.1.2 Epidemiologia

A dengue é a doença mais importante causada por um arbovírus no mundo. Anualmente as infecções com o vírus dengue ocasionam mais de 100 milhões de casos de dengue clássico e mais de 500 mil de dengue hemorrágico. Nos últimos vinte anos têm sido observado um incremento significativo na atividade epidêmica, expansão da distribuição geográfica, transmissão contínua de vários sorotipos e emergência da Febre Hemorrágica da Dengue (DHF) em áreas onde a doença não era prevalente. (HALSTEAD, 2007). Nas Américas, no período de 2001 à 2006 foram notificados 3.419.919 casos de dengue, incluindo 79.664 casos de DHF e 982 mortes, resultando em uma taxa de letalidade de 1,2% (PAHO, 2007). A doença é agora endêmica em mais de 100 países na África, Américas, Leste Mediterrâneo, Sudeste Asiático e Oeste Pacífico (HUANG, *et al.*, 2002), nessas regiões, 90% dos casos de DHF acometem crianças com idade inferior a 15 anos (NORMILE, 2007; EDELMAN, 2005 e 2007). A distribuição global da dengue é importante nas áreas tropicais e subtropicais, sendo a transmissão desse vírus feita por mosquitos do

gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*, caracterizando-se por ser predominantemente urbano na sua distribuição (HALSTEAD, 2007).

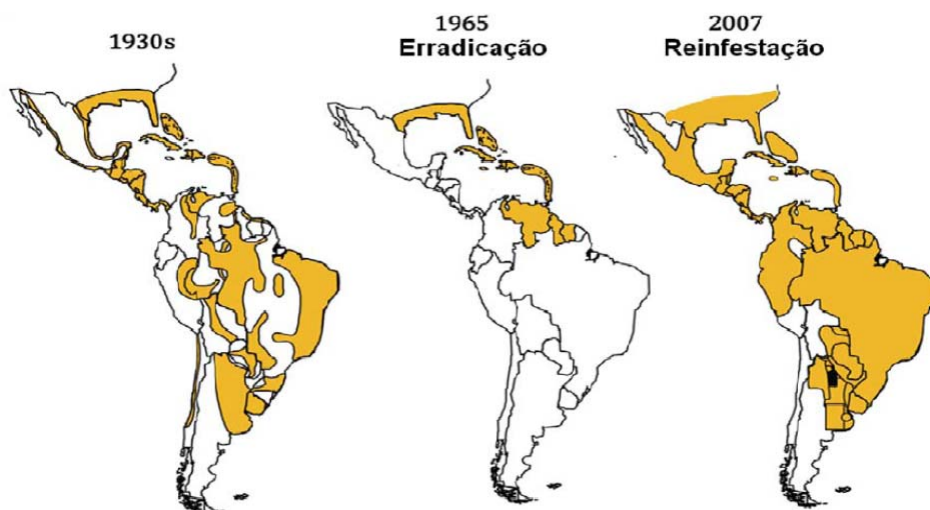
No Brasil, no ano de 2010, até o dia 03 de julho foram notificados 942.153 casos, 58,7% a mais em comparação ao mesmo período do ano anterior. Os estados com maior número de casos foram o Acre (3.619,5 casos por 100 mil habitantes), Mato Grosso do Sul (2.521,1 casos por 100 mil habitantes), Goiás (1.353,1 casos por 100 mil habitantes), Rondônia (1.256,4 casos por 100 mil habitantes), Roraima (1.146,9 casos por 100.000 habitantes) e Mato Grosso (1.095,5 casos por 100 mil habitantes). Esses seis estados concentram 75% dos casos no país. Quanto à Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) foram notificados oficialmente pelas Secretarias Estaduais de Saúde 2.271 casos, com 367 óbitos, sendo que alguns ainda estão sob investigação (Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_dengue\\_se13\\_completo\\_17\\_05\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se13_completo_17_05_10.pdf), acessado em 14 de janeiro de 2011) (Figura 01).



**Figura 01** Número de casos de dengue por semana epidemiológica nas regiões brasileiras no ano de 2009 e 1º semestre de 2010. (Fonte: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_dengue\\_se13\\_completo\\_17\\_05\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se13_completo_17_05_10.pdf), acessado em 14 de janeiro de 2011)

Os fatores responsáveis pelo aumento da dengue como um problema mundial de saúde pública nos últimos 50 anos estão associados com as mudanças sociais e demográficas. Os principais fatores têm sido o crescimento populacional sem precedentes e a urbanização sem planejamento/descontrolada, especialmente nos países tropicais em desenvolvimento. No entanto, mudanças epidemiológicas nas Américas foram as mais drásticas. Nas décadas de 50, 60 e na maior parte da década de 70, epidemias de dengue nas Américas eram raras devido à erradicação

do mosquito vetor (DE PAULA E FONSECA, 2004). Entretanto, o programa de erradicação do mosquito foi descontinuado no início dos anos 70 e essa espécie voltou a aparecer, chegando a reocupar, nos anos 90 (Figura 02), a distribuição geográfica de antes da erradicação (DE PAULA E FONSECA, 2004; TAPIA-CONYER, *et al.*, 2009).



**Figura 02** Reinfestação com *Aedes aegypti* na América Latina. Em laranja áreas infectadas.

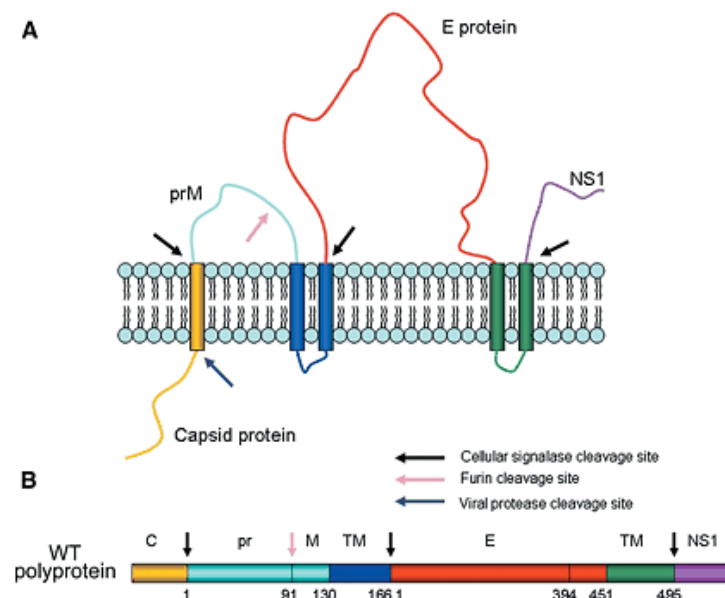
### 1.1.3 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da dengue vão desde infecções assintomáticas a doenças graves caracterizadas por hemorragia e choque, conhecidas como dengue hemorrágica, e que são responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade (DE PAULA E FONSECA, 2004), e geralmente estão associadas à fatores de risco como infecções secundárias, virulência do sorotipo, carga genética e imunidade pré-existente do hospedeiro (GUY, 2008).

### 1.1.4 Estruturas e Sorotipos

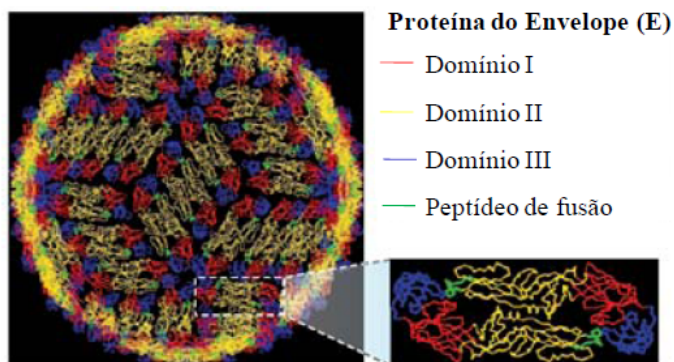
Os dengue vírus apresentam quatro sorotipos antígenicamente relacionados denominados dengue-1 (DENV-1), dengue-2 (DENV-2), dengue-3 (DENV-3) e dengue-4 (DENV-4). Suas partículas virais maduras consistem de um genoma de RNA fita simples polaridade positiva, que funciona como RNA mensageiro após a entrada do mesmo na célula hospedeira. Essa molécula de RNA é circundada por um nucleocapsídeo icosaédrico de 30 nm de diâmetro, recoberto com um envelope lipídico de cerca de 10 nm de espessura derivado da membrana da célula hospedeira (LINDENBACH & RICE, 2001).

O genoma desses vírus, bem como o de todos os outros flavivírus, consiste de um RNA de fita única de 11 kilobases (Kb), compolaridade positiva, cujo peso molecular aproximado é de  $3.3 \times 10^6$  daltons, e expressa as proteínas em uma "long open reading frame" (Figura 03). As proteínas estruturais (C-prM-E) encontram-se na porção 5' e as não-estruturais (NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5) na porção 3' (CHAMBERS, *et al.*, 1990).



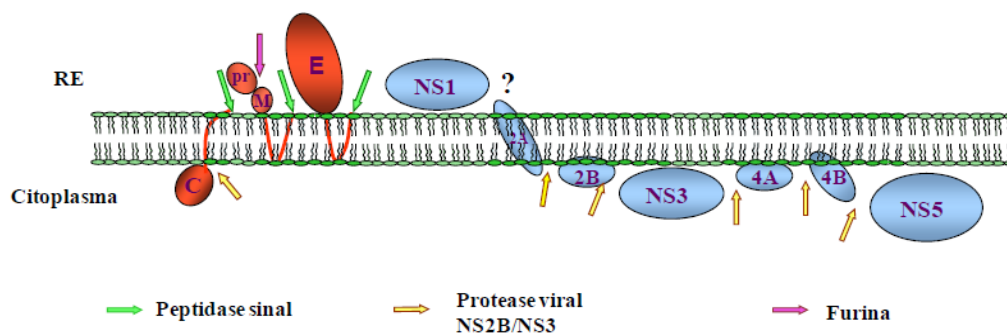
**Figura 03** Proteína truncada contendo as proteínas PrM e E do vírus da dengue e poliproteína (A) Segmentação da poliproteína do vírus da dengue na região N-terminal através da membrana do retículo endoplasmático, mostrando as posições do capsídeo, prM, E e proteínas estruturais. As setas coloridas indicam vários sítios de clivagem da protease. (B) A ordem de proteínas virais na poliproteína de tipo selvagem e na construção de proteínas recombinantes. As proteínas são identificadas pelas mesmas cores que em A (LONG LI, *et al.*, 2008).

O envelope viral apresenta uma bicamada lipídica originada a partir da membrana da célula hospedeira e possui duas proteínas de superfície: prM/M e E (Figura 04 e Figura 05) (MONATH, 1999). A proteína prM (associada à proteína M) forma um heterodímero intracelular, que atua estabilizando a proteína E (LORENZ *et al.*, 2002). prM sofre clivagem durante a exocitose e liberação do vírion, originando a proteína M (LINDENBACH E RICE, 2001) que adquire nova mudança conformacional, a qual é necessária para a correta disposição de E, fato que sugere uma função “chaperona-like” à proteína M (LORENZ *et al.*, 2002).



**Figura 04** Vírus da dengue evidenciando a proteína E e seus domínios.

A proteína E - uma glicoproteína de 53 a 54 kDa - é o principal componente protéico do envelope viral. Participa de atividades biológicas relacionadas com a fusão à membrana celular durante o processo da penetração viral e com a estimulação do sistema imune, pela sua capacidade de induzir anticorpos neutralizantes e resposta de linfócito T (MANDL, *et al.*, 1987; HEINZ, *et al.*, 1990; HENCHAL & PUTNAK, *et al.*, 1990).

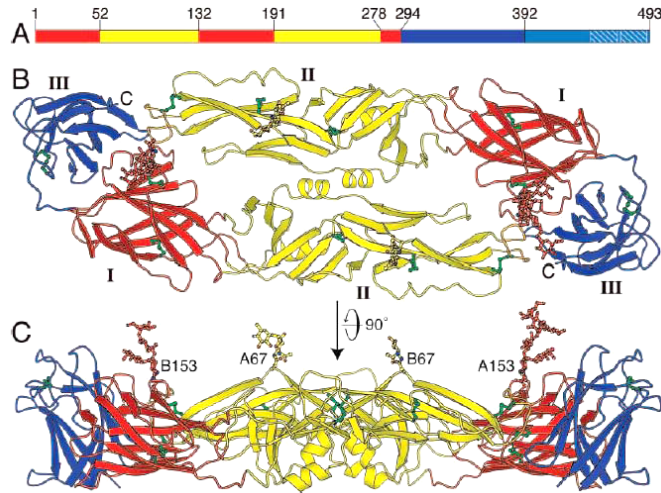


**Figura 05** Topologia de membrana das proteínas de *Flavivirus* no RE. As proteínas estruturais (em vermelho) e as não-estruturais (em azul) são mostradas na membrana do RE, após a tradução e o processamento da poliproteína viral pelas enzimas peptidase sinal, protease viral NS2B/NS3 e furina. A interrogação representa a enzima responsável pela clivagem entre as proteínas NS1 e NS2A, ainda não descrita na literatura. As linhas em vermelho representam os domínios transmembranares das proteínas estruturais.

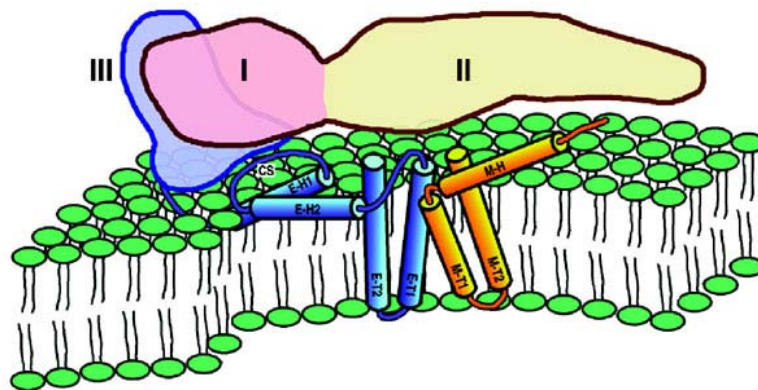
As principais propriedades biológicas do vírus dengue estão relacionadas à proteína E, que recobre totalmente a membrana e o genoma. A proteína E possibilita a ligação dos vírus aos receptores celulares, tem tropismo celular e a capacidade de hemaglutinar eritrócitos. Há alguma variação na composição da proteína E entre os vírus dengue, inclusive nos epítomos. Esses constituem antígenos de superfície que determinam a resposta imune e a proteção contra o vírus da dengue em seres humanos. Devido à sua importância, definem a classificação do vírus em sorotipos. Os anticorpos dirigidos à proteína E determinam a imunidade protetora de mais longa duração (BRICKS, 2004).

Essa proteína apresenta três domínios estruturais (Figura 06): o domínio I (DI) ou domínio central, com aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos que contém predominantemente tipos específicos de epítomos não neutralizantes, o que o leva a ser uma região de dobradiça molecular envolvida na mudança conformacional desencadeada por baixo pH; o domínio II (DII), ou domínio de dimerização da proteína, representa a interface entre os outros dois domínios, está envolvido na fusão da membrana mediada pelo vírus, além disso, contém muitos epítomos de reação cruzada que gera neutralização e não neutralização de anticorpos monoclonais (MAbs); e o domínio III (DIII), que é caracterizado por uma estrutura semelhante a uma imunoglobulina que forma a maioria dos "loops" da superfície viral. Ele contém múltiplos tipos e subtipos específicos de epítomos que gera somente a neutralização viral por MAbs e tem sido hipoteticamente aquele que

contém o local de ligação da célula hospedeira ao anti-receptor. (ROEHRIG *et al.*, 1998 e 1997 e REY *et al.*, 1995) (Figura 07).



**Figura 06** Estrutura da proteína E do vírus dengue-3 presente nas partículas virais maduras. (A) Estrutura primária da proteína E solúvel, apresentando seus três domínios (sem a região de haste e âncora). O domínio I ou central é representado em vermelho, o domínio II ou de dimerização, em amarelo e o domínio III ou tipo Ig, em azul. Os aminoácidos de 393 a 493 representam a região haste âncora (HA) da proteína E, sendo que esta última porção consiste no C-terminal transmembranar dessa proteína. (B) Visão frontal com o eixo duplo de simetria. (C): Vista perpendicular do dímero. Os resíduos glicanas são indicados nos resíduos 67 e 153 do domínio II .



**Figura 07** Representação dos ectodomínios da proteína E e seus domínios transmembranares. O volume ocupado pelo domínio I está representado em rosa, o domínio II em amarelo e o domínio III em azul. As alças das proteínas E e M estão representadas em azul claro e laranja, respectivamente.

Devido a estas características, a proteína E, em especial nesse trabalho o domínio III, tem sido um dos principais alvos no estudo de vacinas e no uso como

reagente (antígeno) no diagnóstico de uma infecção por dengue (SUGRUE *et al.*, 1997).

## 1.2 Diagnóstico e Expressão Heteróloga

### 1.2.1 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da infecção pelos vírus dengue é realizado somente no laboratório e depende do isolamento desses vírus, detecção de antígenos virais ou RNA em soro ou tecidos, ou detecção de anticorpos específicos no soro dos pacientes (KING, *et al.*, 1991; GUZMAN & KOURI, 1996).

Testes sorológicos básicos tem sido usados para diagnóstico da infecção por dengue: inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), teste de neutralização (TN), ELISA tipo captura e sanduíche (DE PAULA & FONSECA, 2004).

O teste de neutralização é o mais específico teste sorológico para o vírus dengue. Por sua elevada especificidade, o TN pode ser empregado para identificar o sorotipo infectante em infecções primárias por dengue, isto é devido à relativa resposta monotípica que é observada no soro de pacientes em fase de convalescência (GUBLER & SATHE, 1988; VORDAM & KUNO; 1997).

Os sistemas imunoenzimáticos têm sido considerados de grande utilidade para o diagnóstico da dengue devido a sua alta sensibilidade e rapidez. A pesquisa de anticorpos distintos, ou seja, de fase aguda (IgM) e de convalescência (IgG), assim como a pesquisa de antígenos (Ag) é possível pelo método de ELISA. Por sua simplicidade de execução e a necessidade de equipamentos não muito sofisticados, esses testes têm se tornado os métodos sorológicos mais utilizados para o diagnóstico da dengue nos últimos anos. Além disso, por serem muito sensíveis no diagnóstico de anticorpos de fase aguda dispensam a necessidade de uma amostra pareada no período de convalescência (GUBLER & SATHE, 1988; VORDAM & KUNO; 1997).

O MAC-ELISA tem sido uma valiosa ferramenta na vigilância da dengue e DHF. Em áreas onde a dengue não é endêmica, esse método pode ser usado na detecção clínica dos casos com sinais de infecção viral ou até mesmo ao acaso, através de uma soro-inspeção da população, podendo identificar uma infecção recente. Durante epidemias, uma vantagem do MAC-ELISA é a determinação rápida da propagação da transmissão. Em áreas onde a dengue é endêmica, MAC-ELISA pode ser usado como um valioso meio na avaliação de um grande número de amostras laboratoriais com relativa facilidade (GUBLER & SATHER, 1988).

O IgG-ELISA tem sido desenvolvido sendo utilizado na diferenciação de infecções primárias e secundárias por dengue (CHUMGUE, *et al.*, 1989). O teste é simples e de fácil manipulação, podendo ser assim utilizado na análise de grandes volumes de amostras. O IgG-ELISA não é muito específico dando reação cruzada com outros flavivirus, e não pode ser utilizado na identificação dos sorotipos virais do dengue (GUBLER, 1998).

Os testes rápidos por imunocromatografia são seguros e de fácil execução, sendo que foram criados devido à necessidade de uma detecção rápida e eficaz. A realização do teste não necessita instrumentação sofisticada, nem mesmo treinamento especial para sua realização. Esse tipo de teste é extremamente atrativo para clínicas e postos de saúde (Programa da Saúde da Família), consultórios médicos, salas de emergência, pequenos hospitais. Esses testes são realizados em uma membrana na qual é fixado um agente marcador utilizado para a identificação do complexo antígeno-anticorpo e, portanto, quantifica ou identifica a presença de um determinado antígeno na amostra analisada (SANCHEZ, 2001). No diagnóstico da dengue, não existe ainda um teste eficaz de imunocromatografia no mercado.

Na atualidade, o maior entrave para um melhor desempenho dos ensaios imunoenzimáticos diz respeito à obtenção dos antígenos. Os principais centros de pesquisa e diagnóstico do mundo têm apresentado grandes dificuldades na obtenção de preparações com conteúdo adequado de antígeno, necessitando concentrar o antígeno através de centrifugação zonal contínua de sobrenadantes de culturas infectadas, sendo que a produção relativamente baixa do vírus dengue nas culturas celulares surge como um obstáculo importante na produção em larga escala dos antígenos empregados em diversos ensaios usados na captura do anticorpo presente no soro do paciente infectado. No Brasil, os antígenos atualmente usados

para diagnóstico da dengue são proteínas virais estruturais, preparados a partir do cérebro de camundongos recém-nascidos artificialmente infectados, essa obtenção de antígenos é extremamente laboriosa e cara.

A realização de testes diagnósticos rápidos e baratos representa uma necessidade crescente no Brasil viabilizando a realização do diagnóstico em larga escala e em todo o país, até nas regiões mais afastadas das grandes cidades. Neste contexto, este trabalho teve o objetivo de obter um antígeno em quantidade e qualidade, utilizando um sistema de expressão heteróloga de proteínas em leveduras.

### 1.2.2 Sistema de Expressão Heteróloga em *Pichia pastoris*

As leveduras, como *P. pastoris* são consideradas promissoras para a produção de diversos metabólitos e proteínas de interesse da indústria biotecnológica moderna (ROMANOS, *et al.*, 1992). Esses organismos unicelulares eucariotos são adequados para esse uso por apresentarem facilidade de crescimento, manutenção e serem facilmente manipuladas geneticamente. Outro fator importante relacionado a esses micro-organismos é sua habilidade de conduzir modificações pós-traducionais específicas de células eucarióticas, muitas vezes essenciais para obtenção de produtos biotecnológicos ativos ou adequadamente processados. Os sistemas de expressão em leveduras são econômicos, apresentam em geral melhores rendimentos e demandam menos tempo e esforços quando comparados a outros sistemas de expressão eucarióticos como os baculovírus e células de mamíferos (CREGG E HIGGINS, 1995). O sistema eucarioto *P. pastoris* é amplamente utilizado na indústria biotecnológica, tem a capacidade de produzir a maior parte das proteínas de forma estável e com modificações pós-traducionais características de proteínas eucarióticas (COLAO *et al.*, 2006).

Dentre as vantagens de utilizar a *P. pastoris* para produzir proteínas heterólogas é o fato dessa levedura apresentar o status GRAS (*Generally Regarded As Safe*), bem como sua capacidade de converter 30% a 40% do seu peso em proteínas (RATNER, 1989), além de glicosilar proteínas de forma mais próxima aos mamíferos, cerca de 8-14 resíduos de manose em cadeias de oligossacarídeos

(GRINNA & TSHOOP, 1989). Esse sistema de expressão é um dos mais produtivos, existindo a probabilidade de 50 a 75% de expressar uma proteína de interesse nessa levedura (HIGGINS & CREGG, 1998).

Nesse trabalho, para obtenção do domínio III da proteína estrutural E do vírus dengue-1 e 2 em larga escala, visando à produção de teste diagnósticos, utilizou-se o sistema PichiaPink<sup>TM</sup> (Invitrogen, USA) que é baseado nos sistemas de expressão em uma cepa mutante de *Pichia pastoris*.

O domínio III da proteína E foi utilizado devido as suas características particulares já descritas e por ser o principal componente do envelope viral, o que possibilita o desenvolvimento de um diagnóstico rápido e seguro. Para tanto, *P. pastoris* foram transformadas com plasmídios que carregam o gene responsável por codificar o domínio III da proteína E. Análises moleculares subsequentes foram realizadas para verificar sua integração no genoma da levedura, sua transcrição e expressão do domínio III da proteína E, que depois de detectada foi purificada e concentrada. Os resultados obtidos neste trabalho contribuirão para o diagnóstico rápido e eficaz da dengue, tendo como consequência a diminuição das complicações por dengue causadas pelo diagnóstico tardio. A correlação entre os kits de diagnóstico rápido, intervenção médica adequada e histórico do paciente contribuirão para o controle da doença e diminuição dos óbitos causados por dengue.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Expressão heteróloga do domínio III da proteína de envelope (E) do vírus dengue-1 e 2 em *Pichia pastoris* (Pichiapink™ System – Invitrogen/USA).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Isolar o gene do domínio III da proteína estrutural E do vírus dengue-1 e 2 e inserí-lo no vetor de clonagem pGEM-T easy (Promega Corporation, Madison, Wisconsin);
- Transformar *Escherichia coli* DH5α com o vetor de clonagem pGEM-T easy contendo os genes isolados;
- Transformar *Escherichia coli* DH5α com o vetor de expressão pPINK-LC (Invitrogen, USA) contendo os genes de interesse;
- Transformar *Pichia pastoris* via *Escherichia coli* DH5α, visando a utilização dessa levedura na produção de proteínas heterólogas;
- Verificar através de análises moleculares a integração do gene que codifica o domínio III da proteína estrutural E do vírus *dengue-1* e *dengue-2* no genoma da levedura.

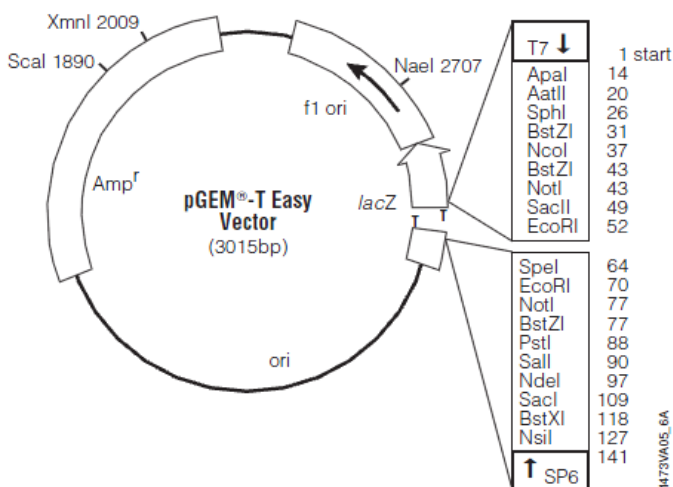
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Estoque Viral

Grupos de 5 camundongos Swiss recém-nascidos, obtidos junto ao Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFV, foram inoculados por via intracerebral com o DENV-1 (Nauru Island) e 2 (New Guinea C). Após aproximadamente 5 dias da infecção, quando os animais começaram a apresentar sinais de encefalite e paralisia, esses foram eutanasiados, congelados e os cérebros foram extraídos, macerados em PBS com albumina bovina a 7,5% e estocados a -70 °C.

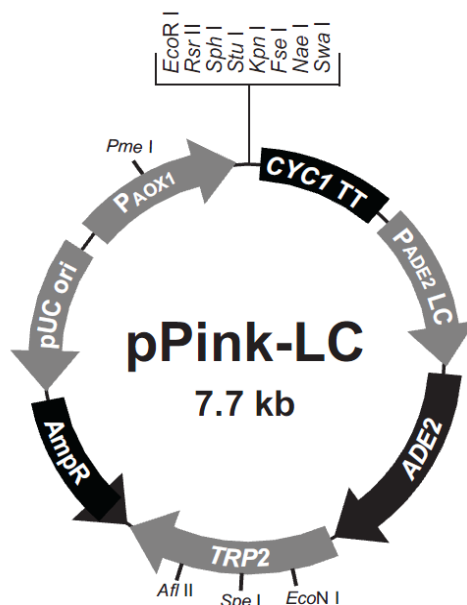
#### 3.2 Plasmídeos

Plasmídeos de clonagem pGEM-T easy (Figura 08) foram adquiridos junto à Promega Corporation (Madison, Wisconsin) para inserção dos genes do domínio III da Proteína E, para posterior transformação de células *E. coli* DH5α competentes.



**Figura 08** Mapa do Plasmídeo de Clonagem pGEM-T easy (Promega Corporation, Madison, Wisconsin).

Plasmídios de expressão pPINK-LC (Figura 09) produzidos pela Invitrogen (USA) foram utilizados na transformação de *Pichia pastoris* (PichiaPink™ System).



**Figura 09** Mapa do Plasmídeo de Expressão pPINK-LC (Invitrogen, USA).

### 3.3 Cepas de *P. pastoris* (PichiaPink™ System) utilizadas

Foram utilizadas cepas de PichiaPink™ (Invitrogen, USA), que são mutantes da levedura *Pichia pastoris* projetadas para a produção de proteínas recombinantes em alto nível e em grande escala. Nesta cepa, a marca auxotrófica é o gene ADE2 que codifica a enzima fosforribosilaminoimidazol carboxilase importante na biossíntese de bases púricas. Sendo que a ausência/presença de adenina no meio de cultura estimula/inibe a expressão desse gene.

### 3.4 Extração do RNA viral

Para a extração do RNA foi utilizado o reagente TRIzol® (Invitrogen, USA). Após adição de 750µl do reagente TRIzol®, foi adicionado 500µl do macerado de

cérebro infectado com DENV-1 e DENV-2, que foi misturado por agitação por 30 segundos e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos.

Após este procedimento foram adicionados 150µl de clorofórmio e a reação foi submetida a uma centrifugação a 12000 g por 15 minutos. A camada aquosa foi então retirada, precipitada com 500 µl de isopropanol e centrifugada a 12000 g por 15 minutos. O precipitado resultante foi então suspenso em etanol 75% gelado, estocado a -70°C por 12 horas e centrifugado a 12000 g por 5 minutos. O precipitado formado foi seco a temperatura ambiente, suspenso em 200 µl de água deionizada e estocado a -70°C.

### 3.5 Confeção do cDNA

Após extração do RNA total das amostras, a primeira fita do cDNA foi confeccionada usando-se o kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen™, New York, USA).

Para tanto, 1µl de “primer” randômico (pd(N)6) (Amersham-Pharmacia, USA) foi adicionado a aproximadamente 11µl de RNA extraído de cada amostra, sendo submetido a aquecimento por 5 minutos a 70°C . Então, uma mistura contendo o tampão da transcriptase reversa, DTT, transcriptase reversa e dNTPs foi realizada. Promoveu-se então o aquecimento dessa mistura por 60 minutos a 37°C e, em seguida, foi adicionada a amostra. Logo após, incubou-se a solução por 20 minutos a 70°C para desnaturar a transcriptase reversa.

### 3.6 Primers e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para realizar a amplificação do gene do domínio III da proteína E do DENV-1 e DENV-2, “primers” flanqueando a região responsável pela codificação do gene foram sintetizados (Tabela 1). Esses “primers” foram desenhados de forma a inserir sítios únicos de restrição para as enzimas *Kpn* I e *EcoR* I, que também foram

utilizadas posteriormente para a clonagem dos mesmos no vetor de expressão pPINK-LC.

**Tabela 1.** Sequência dos “primers” utilizados na amplificação do domínio III da proteína E

Vírus	“Primers”	Sequências	Tam. do fragmento
<b>DENV-1</b>	D1DIIIEcoRI	5'- GAA TTC ATGCAC ACT GCGTTG ACT GGA -3'	413 pb
	D1DIIIKpnI	5'- GGT ACC CTG CTT CCC TTC TTG AAC CAG -3'	
<b>DENV-2</b>	D2DIIIEcoRI	5'- GAA TTC AAG TGC AGG CTG AGA ATG GAC -3'	401 pb
	D2DIIIKpnI	5'- GGT ACC TCG CCC AAA ATG GCC ATT CTT -3'	

As amostras contendo as fitas híbridas de RNA/cDNA foram amplificadas empregando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e os “primers” descritos no subitem anterior. O volume final da reação foi de 50 µL contendo 0,5 pmol/µL dos “primers” sense e antisense, 0,2 mM dNTPs, tampão 1X da enzima e 2,5U da Platinum® *Taq* DNA polymerase, recombinant (Invitrogen™, New York, USA). Para ativação da enzima *Taq* DNA polimerase, foi realizado um ciclo inicial de 94°C por 10 minutos. Em seguida as amplificações foram feitas por 38 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Os fragmentos de DNA foram amplificados corretamente, apresentando aproximadamente 413 pares de bases (pb), foram evidenciados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 1 µg/mL, visualizado à luz ultra-violeta e digitalizado pelo fotodocumentador Vilber Lourmat.

### 3.7 Preparação de bactérias competentes para a transformação

Bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ , previamente estocadas em nosso laboratório em meio LB/DMSO 10% (dimetilsulfóxido) foram semeadas em placas contendo LB/ágar 1,5% e incubadas a 37°C por 18 horas. Uma das colônias isoladas foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido para crescimento durante 18-20 horas a 37°C em agitação orbital constante de 180 rpm, e então 0,5 mL dessa cultura foi inoculado em 50 mL de meio LB, para novo crescimento a 18°C. As bactérias foram colhidas em fase exponencial de crescimento (absorbância a 550 nm em aproximadamente OD 0,6). As bactérias foram então sedimentadas por centrifugação a 4.000 g por 10 minutos a 4°C, e logo suspensas em 0,5 volumes de uma solução de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Após 2 horas de incubação em gelo, as bactérias foram novamente centrifugadas e o precipitado foi suspenso em 0,08 volume de solução tampão FSB (acetato de potássio 10 mM pH 7,5; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 45 mM; CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O 10 mM; KCl 100 mM; glicerol 10%). Para armazenamento das bactérias em freezer -70°C foi adicionado DMSO a 10%. As bactérias foram aliqüotadas em volumes de 200  $\mu$ L, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente estocadas a -70°C.

### 3.8 Clonagem do domínio III da proteína E no plasmídeo de clonagem pGEM-T easy

A ligação dos fragmentos de DNA obtidos na amplificação do cDNA com os “primers” descritos no item 3.6 ao plasmídeo de clonagem pGEM-T easy foi feita com a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs, Massachusetts, EUA). Os fragmentos foram utilizados. Os produtos dessa ligação foram utilizados na transformação de bactérias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , objetivando a produção de clones de plasmídeos recombinantes contendo a região responsável por codificar o domínio III da proteína E do vírus DENV-1 e 2.

Para a ligação T-A, aproximadamente 3  $\mu$ L dos produtos da RT-PCR foram usados numa reação de 10  $\mu$ L, que continha 5  $\mu$ L da solução tampão 2X, 1  $\mu$ L do vetor pGEM-T easy e 1  $\mu$ L da enzima T4 ligase. A reação foi homogeneizada

suavemente e mantida a 4°C por 10 horas. O produto dessa reação foi utilizado para a transformação de células competentes pelo método do choque térmico.

### **3.9 Transformação de células competentes DH5α com o vetor de clonagem**

Para a transformação de células competentes com o produto da ligação, as alíquotas de células foram descongeladas em banho de gelo e 5 µL das reações de ligação foram adicionados às alíquotas, que foram mantidas em gelo por 20 minutos. Em seguida, as células foram levadas ao banho-maria a 42°C, por exatamente 40 segundos e depois rapidamente levadas ao gelo novamente. Foram adicionados 800 µL de meio SOC a cada alíquota de células, que então foram levadas a agitação orbital por 150 rpm por 1 hora a 37°C. Após agitação, 50-100 µL de cada cultura foram semeados em placas contendo LB/ágar 1,5%, contendo antibiótico (ampicilina 100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias obtidas nas placas de transformação foram processadas para isolamento do DNA plasmidial (modificado de Sambrook et al, 1989).

### **3.10 Análise do DNA plasmidial extraído das colônias DH5α transformadas com o vetor de clonagem**

Os plasmídeos foram extraídos através do método da lise alcalina (MANIATIS, FRITSCH & SAMBROOK, 1989). Para tanto, cada colônia obtida das transformações foi cultivada em 3 mL de meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL a 37°C, sob agitação constante de 180 rpm, por aproximadamente 18 horas. As suspensões bacterianas foram centrifugadas por 10.000 g por 2 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados de células foram suspensos em 200 µL de tampão de suspensão (glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. A cada amostra foram adicionados 400 µL de uma solução alcalina fresca ou tampão de lise (NaOH 0,2N; SDS 1%), essas foram homogeneizadas e incubadas em gelo por 5 minutos.

Em seguida, 300  $\mu\text{L}$  de solução de acetato de amônio 7,5 M foram adicionados a cada amostra, e essas foram incubadas em gelo por no mínimo 40 minutos para a precipitação de RNA de alto peso molecular e DNA cromossomal. Procedeu-se à centrifugação dessas amostras a 10.000 g por 3 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 0,6 volumes (aproximadamente 480  $\mu\text{L}$ ) de isopropanol, incubando-os por 20 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas por 15.000 g por 10 minutos para a sedimentação do DNA plasmidial. Os precipitados obtidos foram lavados com etanol 70%, suspensos em 50  $\mu\text{L}$  de água deionizada e armazenado em freezer a -20 oC.

O DNA plasmidial extraído das colônias transformantes foi submetido à reação de PCR para a detecção de clones que foram efetivamente transformados com o vetor pGEM-T easy contendo o inserto de interesse. Os produtos do PCR foram visualizados em gel de agarose 1,2% submetido a luz violeta e digitalizado pelo fotodocumentador Vilber Lourmat. Os clones positivos para a presença dos insertos foram estocados a -70 oC, na proporção de 70% de suspensão bacteriana, em LB líquido, para 30% de glicerol estéril.

### 3.11 Ensaio de restrição

Os plasmídeos recombinantes purificados foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas de restrição previamente selecionadas: *EcoRI* e *KpnI* (Invitrogen, Califórnia, EUA) para a liberação dos fragmentos de aproximadamente 413 pb, correspondente a região responsável por codificar o domínio III da proteína E. As reações foram realizadas conforme instruções do fabricante, num volume final de 20  $\mu\text{L}$  contendo, 1U da enzima por  $\mu\text{g}$  de DNA. Os volumes utilizados foram de 2  $\mu\text{L}$  de tampão React 2  $\mu\text{L}$  do plasmídeo pGEM-T easy com o inserto de aproximadamente 413 pb e 1  $\mu\text{L}$  de *KpnI*. As reações foram levadas ao banho-maria 37°C por 8 horas e em seguida, mais 2  $\mu\text{L}$  de tampão React 3 e 1  $\mu\text{L}$  de *EcoRI* foram adicionados às reações, mantendo-as novamente em banho-maria 37°C, por aproximadamente 5 horas. Os fragmentos de tamanho esperado foram evidenciados em gel de agarose 1,2%, visualizado à luz ultravioleta e recuperados

do gel pelo “kit” Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin).

O plasmídeo de expressão também foi submetido à digestão enzimática pelas mesmas enzimas e utilizando o mesmo protocolo mencionado acima, para a formação de extremidades coesivas capazes de receber o inserto correspondente ao domínio III da proteína E e ligá-lo na orientação correta para expressão no vetor pPINK-LC. Os plasmídeos digeridos foram visualizados também em gel de agarose 1%, submetido à luz ultravioleta e recuperados do gel através do “kit” Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

### **3.12 Transformação de células competentes DH5α com o vetor de expressão**

Para a transformação de células competentes com o vetor de expressão pPINK-LC contendo o inserto, utilizou-se a mesma metodologia utilizada para transformação de células *E. coli* DH5α com o vetor de clonagem.

### **3.13 Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas com o vetor de expressão**

Cada colônia obtida das transformações foi cultivada da mesma forma realizada com as células *E. coli* DH5α transformadas com o vetor de clonagem.

O DNA plasmidial extraído das colônias transformantes foi submetido à reação de PCR para a detecção de clones que foram efetivamente transformados com o vetor pPINK-LC contendo o inserto de interesse. Os produtos do PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, submetido a luz violeta e digitalizado pelo fotodocumentador Vilber Lourmat. Os clones positivos para a presença dos insertos foram estocados a -70 °C, na proporção de 70% de suspensão bacteriana, em LB líquido, para 30% de glicerol estéril.

### 3.14 Ensaio de restrição

O plasmídeo de expressão também foi submetido à digestão enzimática pelas mesmas enzimas utilizadas para a liberação do inserto do vetor de clonagem e utilizou-se o mesmo protocolo mencionado anteriormente, para a formação de extremidades coesivas capazes de receber o inserto correspondente ao domínio III da proteína E e ligá-lo na orientação correta para no vetor pPINK-LC. Os plasmídeos digeridos foram visualizados também em gel de agarose 1% submetido à luz ultravioleta e recuperados do gel através do “kit” Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

### 3.15 Transformação em *Pichia pastoris* (PichiaPink™ System)

Células da levedura *Pichia pastoris* cepa PichiaPink™ (Invitrogen, USA) foram crescidas em meio YPD ágar até o aparecimento de colônias isoladas. Foi realizado um pré-inóculo com 10 ml de YPD em Erlenmeyer de 125 ml utilizando uma colônia isolada e fresca de levedura. O pré-inóculo foi incubado a 28°C durante 12 horas em shaker a 300 rpm. No dia seguinte, quando a OD<sub>600</sub> atingiu 0.2 o pré-inóculo foi adicionado a 100 ml de YPD em Erlenmeyer de 1 L.

Quando o inóculo atingiu a OD<sub>600</sub> de 1.4 fez-se incubação no gelo por 15 minutos para cessar o crescimento. As células foram centrifugadas a 1.500 x g por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso em 250 ml de água gelada. Foi realizada uma outra centrifugação nas mesmas condições anteriores e o precipitado suspenso em 50 ml de água estéril gelada. Após mais uma centrifugação nas mesmas condições, as células foram suspensas a 10 ml de sorbitol 1 M gelado. As células então, foram aliqüotadas e mantidas no gelo. Foram misturados 80 µL de célula com aproximadamente 5 µg de DNA linearizado. A mistura foi colocada em 4 cubetas de 0.2 cm e incubada por 5 minutos no gelo. A eletroporação das 4 cubetas foi realizada com os seguintes parâmetros: 1.500 v, 25 µF, 400 Ω. Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado e misturado meio YPDS gelado. Seguiu-se a incubação a 28°C por 4 horas sem agitação.

Após a incubação, foi semeado 120 µL por placa de meio MD, totalizando 12 placas, que foram incubadas 28°C por 7 dias até o crescimento de colônias. As colônias que apresentaram coloração branca (evidência de transformação) obtidas nas placas de transformação foram processadas para isolamento do DNA.

### **3.17 Análise do DNA extraído das colônias transformantes de *Pichia pastoris* (PichiaPink™ System)**

As colônias testadas cresceram em 10 ml de meio YPD até atingirem uma OD<sub>600</sub> em torno de 0,5, quando foram centrifugadas a 1.500 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, as células foram lavadas em 10 ml de água miliQ e novamente centrifugadas, como no passo anterior. Posteriormente, fez-se uma suspensão em 2 ml de tampão SCED (1 M de sorbitol, 10 mM de citrato de sódio – pH 7,5, 10 mM de EDTA e 10 mM de DDT), pH 7,5. Adicionou-se 0,2 mg de zimoliase, incubou-se a 37°C por 50 minutos. Após a incubação, foi adicionado 2 ml de SDS 1%, misturado suavemente, e incubado em gelo por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1,5 ml de acetado de potássio 5 M – pH 8,9, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C, onde o sobrenadante foi recuperado e adicionado de 2 volumes de etanol, sendo incubado a temperatura ambiente por 15 minutos.

Após a incubação, fez-se uma centrifugação de 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso suavemente em 0,7 ml de buffer TE (Tris-EDTA) pH 7,4 e adicionado a um volume equivalente de fenol:clorofórmio (1:1 v/v), seguido da adição de um mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi recuperada, dividida em 2 tubos, adicionado meio volume de acetato de amônio 7,5 M - pH 7,5, e dois volumes de etanol em cada tubo, encubado por 10 minutos em gelo. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C, os precipitados foram lavados com 1 ml de etanol 70% e logo após suspenso em 50 µl de água ultrapura.

O DNA extraído das colônias transformantes foi submetido à reação de PCR para a detecção de clones que foram efetivamente transformados com o vetor pPINK-LC, contendo o inserto de interesse. Os produtos do PCR foram visualizados

em gel de agarose 1%, submetido a luz violeta e digitalizado pelo fotodocumentador Vilber Lourmat. Os clones positivos para a presença dos insertos foram estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , na proporção de 50% de suspensão da cultura em YPD líquido para 50% de glicerol estéril.

### **3.18 Expressão da proteína E**

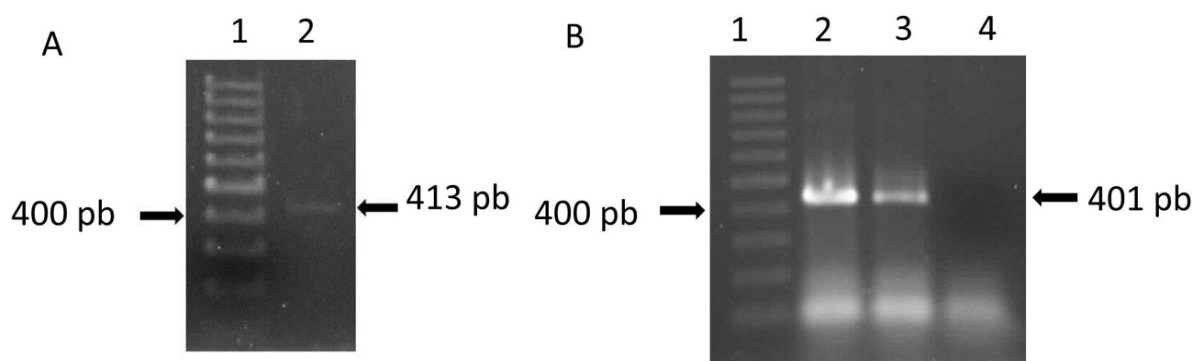
A biomassa proveniente de um litro de cultura foi coletada por centrifugação,  $7.000\times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , ressuspensa em 50mL de tampão de lise, PBS contendo 1% de Triton X-100, e incubadas por 30 minutos em gelo. Posteriormente, foram lisadas com auxílio de sonda de ultrassom (Branson sonifier 250 analógico), foram realizados 5 pulsos de 100W por 30 segundos, com intervalos regulares de um minuto entre cada pulso, em banho de gelo. A amostra lisada foi centrifugada,  $7.000\times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , após a centrifugação o sobrenadante foi clarificado por filtração em papel de filtro, para a etapa de purificação.

Na etapa cromatográfica de purificação, utilizou-se resina de afinidade HisTrap FF crude (GE Healthcare) de 1mL de volume de coluna, acoplada a um sistema automatizado Pharmacia (Pharmacia), visando a purificação da proteína de fusão (histag+proteína dengue). A resina foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna, de tampão de equilíbrio, fosfato de sódio 20mM, NaCl 0,5M e 10mM de Imidazol pH7,4, então o sobrenadante do lisado já clarificado, foi aplicado na coluna, com fluxo de 1ml por minuto. Após lavagem da resina, com aproximadamente 15 volumes de tampão de equilíbrio, a amostra referente à proteína de fusão, foi eluída com tampão fosfato de sódio 20mM, NaCl 0,5M e 0,5M de Imidazol pH7,4 e coletada em banho de gelo. Alíquotas de todas as etapas da purificação foram submetidas a ensaios eletroforéticos em gel de poliacrilamida, para caracterização.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Extração de RNA, Síntese de cDNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Primeiramente foi realizado a extração do RNA total das amostras, o qual serviu de base para a síntese das fitas de cDNA, que foram submetidas a uma Reação de Cadeia da Polimerase. Os genes responsável por codificar o domínio III da proteína E de DENV-1 (413 pb) e de DENV-2 (401 pb) foram detectados (Figura 10).

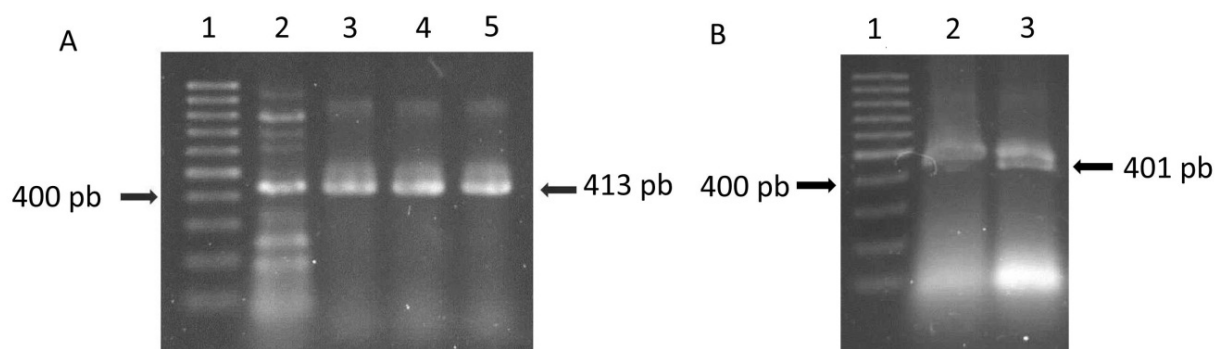


**Figura 10** Detecção do gene que codifica o domínio III da proteína E. Gel de agarose a 1%: **A.** DENGUE-1: 1- Marcador de DNA de 100 pb (100 pb DNA Ladder, Invitrogen, Califórnia, USA); 2- Fragmento de 413 pb correspondente ao gene do domínio III; **B.** DENGUE-2: 1- Marcador de DNA de 100 pb; 2 a 3- Fragmento de 401 pb correspondente ao gene do domínio III; 4- Controle negativo.

### 4.2 Clonagem do gene do domínio III da proteína E em vetor pGEM-T easy

Clonou-se os genes do domínio III da proteína E de DENV-1 e DENV-2 no vetor pGEM-T easy para transformação de células competentes *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , as quais, após transformadas, foram estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foi feita a extração de plasmídeos, seguida de uma nova amplificação para verificar a

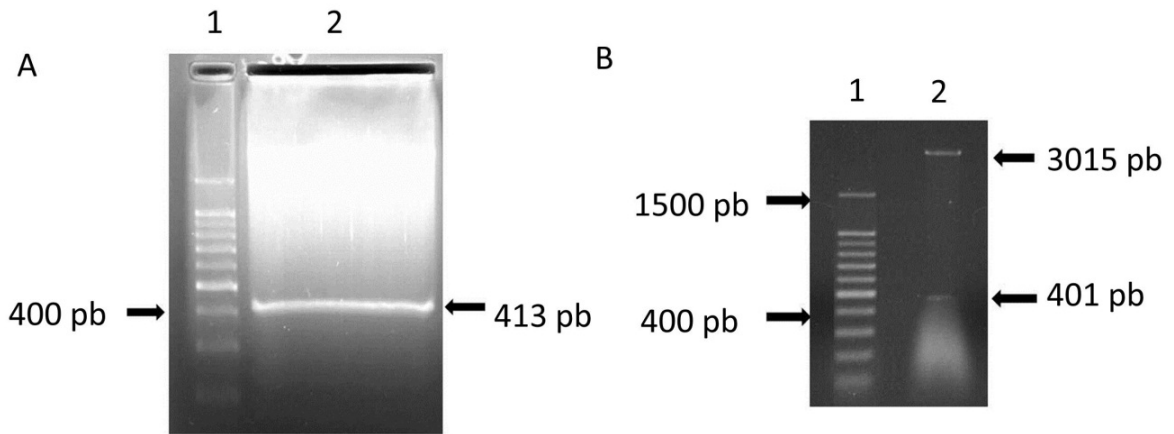
presença de insertos ligados ao vetor de clonagem. Este processo foi realizado através dos “primers” D1DIIIEcorI, D1DIIIKpnI, D2DIIIEcorI e D2DIIIKpnI e o resultado das amplificações foi detectado em gel de agarose a 1% (Figura 11).



**Figura 11** Amplificação do gene que codifica o domínio III da proteína E por PCR de Colônia. Gel de agarose a 1%: **A.** DENGUE-1: 1- Marcador de DNA de 100 pb; 2- Controle positivo demonstrando presença de banda com 413 pb; 3 a 5- três bandas referentes a fragmentos de 413 pb correspondente às colônias 05, 10 e 14 respectivamente; **B.** DENGUE-2: 1- Marcador de DNA de 100 pb; 2 a 3- duas bandas referentes a fragmentos de 401 pb correspondente às colônias 1 e 2.

### 4.3 Digestão do plasmídeo pGEM-T easy/DIII

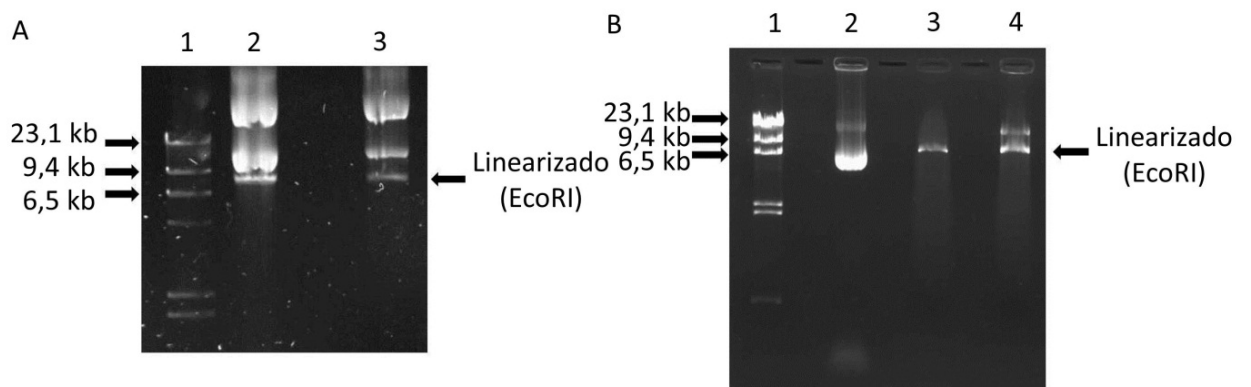
As bactérias transformadas com o vetor de clonagem contendo o inserto foram crescidas em meio seletivo. Os plasmídios pGEM-T easy/D1/DIII e pGEM-T easy/D2/DIII foram submetidos a uma dupla digestão através das enzimas *EcoR* I e *Kpn* I, que teve como consequência a liberação do domínio III da proteína E do dengue-1 e dengue-2 (Figura 12).



**Figura 12** Dupla digestão do plasmídeo pGEM-T easy/DIII. Gel de agarose 1%: **A.** DENGUE-1: 1- Marcador de DNA 100 pb; 2- Fragmento de 413 pb correspondente ao gene do DIII; **B.** DENGUE-2: 1- Marcador de DNA 100 pb; 2- Fragmento de 401 pb correspondente ao gene do DIII.

#### 4.4 Extração do plasmídeo pPINK-LC

Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas com o vetor pPINK-LC (Dengue-1 e Dengue-2) e crescidas em meio seletivo para realizar extração de DNA plasmidial. Posteriormente, foi realizado PCR para confirmar presença dos vetores que foi comprovada através de gel de agarose, o qual demonstrou a presença dos mesmos na sua forma linearizada (Figura 13).



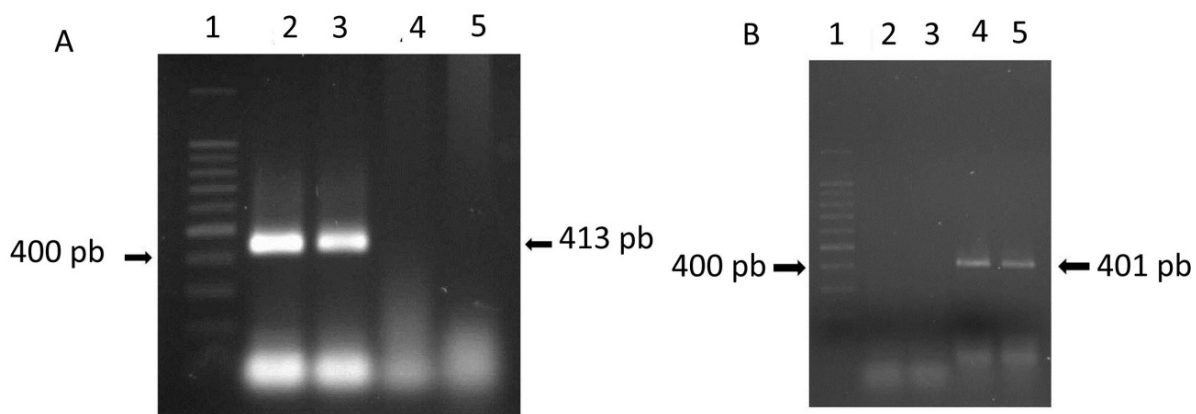
**Figura 13** Presença do vetor pPINK-LC em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ . **A.** DENGUE-1: Gel de agarose a 1%: 1- Marcador de DNA  $\lambda$  Hind III; 2 a 3- Plasmídeos pPINK-LC extraídos de 2 estoques diferentes de células *E. coli* transformadas; **B.** DENGUE-2: Gel de agarose a 0,8%: 1- Marcador de DNA  $\lambda$  Hind III; 2- Controle Positivo; 3- Plasmídeo pPINK-LC extraído por midiprep de células *E. coli* transformadas; 4- Plasmídeo pPINK-LC extraído por miniprep de células *E. coli* transformadas.

#### 4.5 Digestão do plasmídio pPINK-LC

Após a extração dos plasmídeos, os mesmos foram submetidos a dupla digestão através das enzimas *EcoR* I e *Kpn* I. Como produto desse processo foi obtido uma banda de 7,7 kb correspondente ao vetor pPINK-LC em condições de se ligar ao inserto.

#### 4.6 Análise e Seleção das colônias transformadas

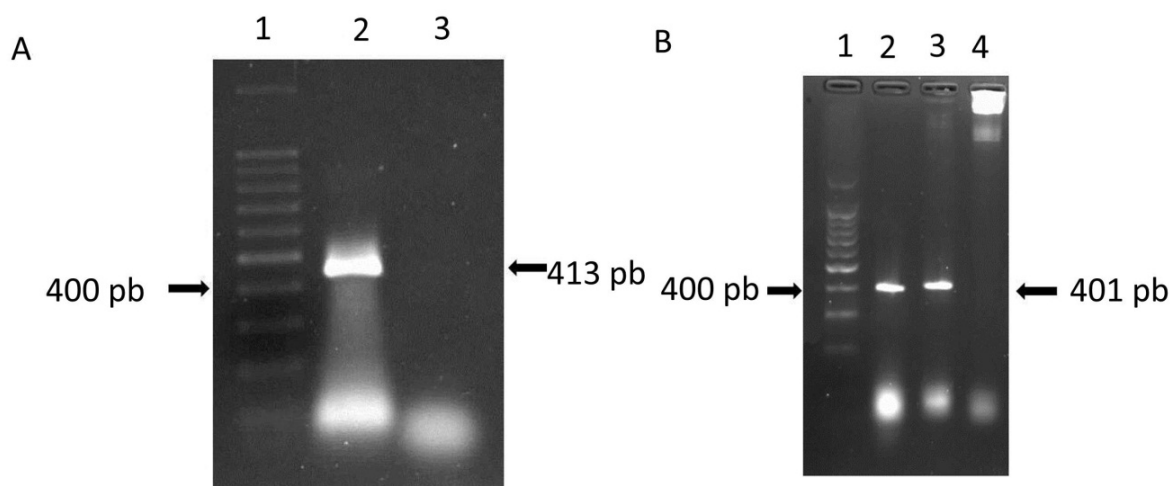
Após a dupla digestão dos plasmídeos de expressão pPINK-LC (Dengue-1 e Dengue-2), foi realizada a ligação dos vetores ao gene do domínio III da proteína E de DENV-1 e DENV-2. Após a ligação, as bactérias foram transformadas e as colônias resultantes tiveram seu DNA extraído para análise da presença dos vetores e dos insertos de interesse (Figura 14).



**Figura 14** Amplificação do gene DIII de DENV-1 e DENV-2 extraído de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o vetor pPINK-LC/DIII. **A.** DENGUE-1: Gel de agarose 1%: 1- Marcador de DNA de 100 pb; 2 a 3- Bandas apresentando 413 pb referentes ao gene do domínio III da proteína E (colônias 1 e 2, respectivamente); 4 e 5- Colônias 3 e 4 que não foram transformadas com o vetor de expressão; **B.** DENGUE-2: Gel de agarose a 1,7%: 1- Marcador de DNA de 100 pb; 2 e 3- vetor pPINK vazios; 4 e 5- bandas apresentando 401 pb referentes ao gene do domínio III da proteína E.

#### 4.7 Detecção da transformação de *Pichia pastoris*: Extração de DNA e PCR

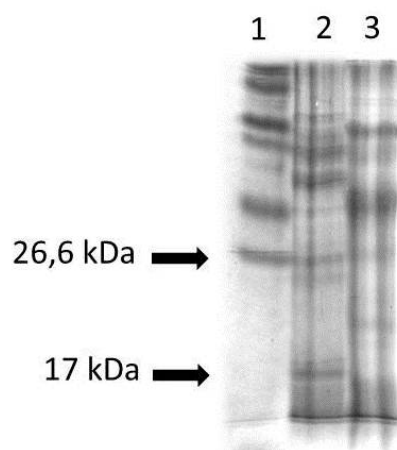
Leveduras *Pichia pastoris* (PichiaPink™ – Invitrogen/USA) foram transformadas por eletroporação com o vetor de expressão pPINK-LC/D1/DIII e pPINK-LC/D2/DIII. O DNA genômico de *P. pastoris* foi extraído para avaliar a presença dos genes responsáveis por codificar o domínio III da proteínas E dos vírus dengue-1 e dengue-2. A Figura 15 apresenta amplificação de PCR desses genes nas colônias transformantes, o que confirma a integração dos genes de interesse ao genoma da levedura.



**Figura 15** Amplificação do gene DIII/DENV1 inserido em leveduras *P. pastoris* (PichiaPink™) transformadas com o vetor pPINK-LC/DIII. **A.** DENGUE-1: Gel de agarose 1%: 1- Marcador de DNA de 100 pb; 2- Banda apresentando 413 pb referente ao gene do domínio III da proteína E; 3- Controle negativo; **B.** DENGUE-2: Gel de agarose 1,7%: 1- Marcador de DNA de 100 pb; 2 e 3- Bandas apresentando 401 pb referentes ao gene do domínio III da proteína E (mesma amostra); 4- Controle negativo.

#### 4.8 Expressão da proteína E do vírus dengue-1

Para verificar se a proteína de interesse estava sendo expressa, foi realizado ensaios preliminares de expressão da mesma seguido de análise em SDS-PAGE. Como produto desse processo foi obtido uma banda de 17 kDa coerente com o peso molecular estimado do domínio III da proteína E do vírus dengue-1, demonstrando que provavelmente a transformação de *Pichia pastoris* foi eficiente (figura 16).



**Figura 16** SDS-PAGE pós separação cromatográfica do lisado celular de cultura de *Pichia pastoris* transformadas com o DIII da proteína E do vírus dengue-1 em coluna HisTrap FF crude.: 1- Marcador Molecular; 2- Banda de 17 kDa coerente com o peso molecular estimado do domínio III da proteína E; 3- Controle negativo.

## 5 DISCUSSÃO

*Pichia pastoris* está cada vez mais cotada para expressão heteróloga de proteínas. Esta levedura haploide e metilotrófica apresenta vantagens em relação aos sistemas de expressão em procariotos, mantendo a fácil manipulação genética associada ao crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples, permitindo a sua expansão para a produção de proteínas em escalas industriais, além de possuir um forte promotor induzível por metanol. Outra vantagem do uso de *P. pastoris* baseia-se no fato de ter capacidade fermentativa pobre, tendo preferência por crescimento respiratório, o que permite a obtenção de cultivos com densidades celulares extremas sem que os produtos da fermentação causem danos de toxicidade para as células (CEREGHINO & CREGG, 1999 e 2000; GELLISSEN, 2000; TORRES & MORAES, 2000; CEREGHINO et al., 2002).

Por ser um organismo eucarioto simples, a *P. pastoris* proporciona a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais, como a glicosilação e adição de pontes dissulfídicas, além de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, simplificando etapas de purificação (CEREGHINO & CREGG, 1999). Neste trabalho, construímos um sistema de expressão heteróloga em *Pichia pastoris* para obtenção do domínio III da proteína estrutural E dos vírus dengue-1 e dengue-2 em larga escala visando a produção de testes diagnósticos.

A proteína E está presente na superfície do DENV, e é responsável pela ligação viral ao receptor celular, fusão do envelope viral com a membrana do endossomo e montagem de partículas virais. Representa o antígeno dominante do vírus sendo o principal alvo de anticorpos neutralizantes. O domínio III desta proteína, neste contexto, é o mais relevante, pois contém o local de ligação da célula hospedeira ao anti-receptor, o que justifica a sua utilização neste trabalho como antígeno para produção de kits de diagnóstico rápido (REY et al, 1995 and ROEHRIG et al, 1998).

Os resultados obtidos demonstraram a clonagem dos genes do DIII da proteína E de DENV-1 e 2 e confirmaram a presença desses nos plasmídios pGEM-T easy e pPINK-LC. Os genes clonados apresentam 413 pb (DENV-1) e 401 pb

(DENV-2) e foram amplificados utilizando primers específicos, que flanqueiam a região do gene da proteína. A confirmação da clonagem foi feita a partir de PCR e a análise em gel de agarose demonstrou que os produtos da PCR apresentavam tamanho próximo à 400 pb quando comparado aos marcadores moleculares. Por similaridade de tamanho, o resultado indica que as sequências obtidas correspondem aos genes dos DIII da proteína E de DENV-1 e 2.

Na primeira etapa dessa pesquisa, os vetores de clonagem foram construídos, p-GEM-T easy/D1/DIII, que contem o gene do DIII de dengue-1 e p-GEM-T easy/D2/DIII que contem o gene do DIII de dengue-2. Esses plasmídios foram utilizados para clonar células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , originando bactérias recombinantes, com o objetivo de produzir múltiplas cópias dos insertos. Na etapa seguinte, os genes de interesse foram inseridos no vetor de expressão, pPINK-LC/D1/DIII para dengue-1 e pPINK-LC/D2/DIII para dengue-2. Esses plasmídios foram utilizados para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ , originando bactérias recombinantes que foram utilizadas como sistema de transferência de genes para uma cepa mutante de *Pichia pastoris*.

Para confirmação da transformação no vetor de clonagem e no de expressão, foi feita PCR e eletroforese que demonstrou bandas de 413 pb (DENV-1) e 401 pb (DENV-2), confirmando a presença do inserto do DIII das duas cepas virais.

Os plasmídios de expressão construídos foram utilizados para transformar *Pichia pastoris* que é capaz de crescer através da utilização de metanol como fonte única de carbono, sendo que esta rota metabólica é totalmente reprimida na presença de outra fonte, como glicerol. Enzimas que participam desta rota estão presentes em altos níveis na célula, como a Álcool Oxidase (AOX) que pode chegar a níveis acima de 30% do total de proteínas celulares, no entanto, estas mesmas enzimas não são detectáveis quando outras fontes de carbono estão disponíveis (CEREGHINO & CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000).

A primeira etapa no metabolismo do metanol é a sua oxidação pela AOX, resultando na formação de formaldeído e peróxido de hidrogênio, o qual é enviado para os peroxissomos para evitar a toxicidade. Por ter pouca afinidade com O<sub>2</sub>, a AOX é gerada em grandes quantidades pela célula, como forma de compensação. Dois genes codificam para a enzima AOX: *AOX1* e *AOX2*, sendo o primeiro responsável por grande parte da presença de AOX ativa nas células. A regulação dos genes envolve dois mecanismos: inibição/desinibição mais um mecanismo de

indução (COUDERC & BARATTI, 1980; 21 CREGG et al., 1985, CEREGHINO & CREGG, 2000).

Os vetores utilizados para a transformação da *P. pastoris* beneficiam-se da forte repressão exercida sobre os genes *AOX* e na facilidade de induzí-los, permitindo que altas densidades celulares sejam obtidas sem que a proteína heteróloga, a qual pode ser tóxica, seja expressa (GELLISSEN, 2000). Vetores utilizados para a geração de recombinantes são integrados no genoma de forma randômica ou por recombinação homóloga, garantindo maior estabilidade do inserto (CEREGHINO & CREGG, 2000).

A presença, no vetor, de uma seqüência compartilhada com o genoma estimula os eventos de recombinação homóloga. Utilizamos o vetor pPINK-LC que possui a seqüência 5' do promotor *AOX1* e na 3', uma seqüência necessária para conduzir o término da transcrição. Entre as seqüências promotoras e terminadoras, há um sítio de múltipla clonagem para a inserção do gene heterólogo. Além disso, esse vetor não permite que as proteínas sejam secretadas no meio, já que não apresenta a seqüência sinal do -Mating Factor (-MF) de *Saccharomyces cerevisiae* fusionada (encontrada nas versões "α" do mesmo vetor). Para a manutenção e replicação do plasmídeo em *E. coli*, há uma origem de replicação de procariotos, sendo que a seleção, em procariotos como é realizada através do gene de resistência ao antibiótico Ampicilina. Já em leveduras (*Pichia Pink*) a seleção se dá pelo gene *ADE2*, deletado nas leveduras e presente no vetor, de forma que a levedura não transformada é dependente a adição de Adenina no meio de cultivo.

Todos os vetores de expressão integrativos para *Pichia pastoris* como pPINK-LC possuem pelo menos uma seqüência de DNA homóloga a uma seqüência de DNA do genoma da *P. pastoris*. A digestão através de enzimas de restrição do vetor pode direcioná-lo de duas formas: por *crossover* simples (integração de todo o vetor – integração por adição); ou por *crossover* duplo entre as regiões homólogas provocando a deleção da região homóloga da levedura (integração por deleção). Independente do tipo de integração ocorrida, os transformantes podem não conter o vetor de expressão por causa de eventos de conversão gênica, que ocorrem quando há recombinação somente entre as regiões homólogas, não ocorrendo qualquer adição da seqüência do vetor (HUANG et al, 2002).

Células de *Pichia pastoris* foram transformadas via *E. coli* DH5α com plasmídios de expressão (pPINK-LC/D1/DIII e pPINK-LC/D2/DIII) através de

eletroporação. Para confirmação da transformação das colônias de *P. pastoris* transformantes foi realizada extração do genoma e PCR seguida de análise em gel de agarose, onde pode-se constatar a presença das bandas de 413 pb e 401 pb para DENV-1 e 2, respectivamente.

Para o vírus dengue-1, ensaios preliminares de separação cromatográfica seguida de SDS-PAGE mostraram uma banda de 17 kda coerente com o tamanho estimado do domínio III da proteína E, sugerindo que a expressão está ocorrendo de forma adequada. Testes mais sensíveis como *Western Blot* deverão ser realizados para confirmação. Para dengue-2, os mesmos ensaios serão realizados.

Diversas proteínas virais de interesse médico ou veterinário já foram eficientemente expressas em *P. pastoris*, inclusive proteínas estruturais do vírus da Dengue (SUGRUE *et al*, 1997; BISHT *et al*, 2001; WEI *et al*, 2003; VALDÉS *et al*, 2007) demonstrando que esta levedura pode ser um recurso para a expressão de proteínas de forma segura e em larga escala, possibilitando o uso destas tanto em vacinas como em exames de diagnóstico.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi demonstrado que as colônias de *Pichia pastoris* apresentaram a integração do gene codificador do domínio III da proteína E dos vírus dengue-1 e 2. Os ensaios de expressão têm sido animadores e sugerem que o sistema de expressão heteróloga em *Pichia pastoris* é de fato eficiente.

Ensaio de expressão/purificação serão realizados para dengue-2 e ampliados para dengue-1. Seguida as confirmações, deverá ser padronizado um protocolo de produção em larga escala.

As proteínas recombinantes produzidas a partir das leveduras transformadas poderão ser utilizadas para desenvolvimento de kits de diagnóstico. Como consequência, a realização desses exames em pacientes suspeitos permitirá um diagnóstico mais rápido, com uma intervenção clínica em tempo hábil colaborando, através da correlação com o histórico do paciente, para evitar ocorrências como a febre hemorrágica. Além disso, um diagnóstico mais rápido permite ações de vigilância epidemiológica imediatas, o que tem como consequência um maior controle da disseminação da doença evitando o surgimento de novos casos.

## REFERÊNCIAS

BISHT, H.; CHUGH, D. A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. **Expression and purification of Dengue Virus type envelope protein as a fusion with Hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris***. Protein Expression and Purification, v. 23, p. 78-96, 2001.

CHAMBERS, T.J., WEIR, R.C., GRAKOUL, A. **Evidence that the N-terminal domain of non-structural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral protein**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8898-8902. 1990.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. **Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis**. Current Opinion in Biotechnology, v. 10, p. 422-427, 1999.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. **Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris***. FEMS Microbiology Reviews, v. 24, p. 45-66, 2000.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. **Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris***. Current Opinion in Biotechnology, v. 13, p. 329-332, 2002.

COUDERC, R.; BARATTI, J. **Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase**. Agricultural and Biological Chemistry, v. 44, p. 2279-2289, 1980.

CREGG J.M. & HIGGINS D.R. **Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris***. Can J. Bot. 1995, 73:891-897. 1995.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. ***Pichia pastoris* as a host system for transformations**. Molecular and Cellular Biology, v. 5, 13 n. 12, p. 3376-3385, 1985.

DE PAULA S.O., FONSECA B.A.L. **Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis**. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 8(6):390-398. 2004.

FRANCKI, R.I.B., FAUQUET, G.M., KNUDSON, D.L., BROWN, F. **Classification and nomenclature of viruses**: fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol., 2:223-233.1991.

GELLISSEN, G. **Heterologous protein production in methylotrophic yeasts**. Applied Microbiology & Biotechnology, v. 54, p. 741-750, 2000.

GUBLER D.J. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Clinical Microbiology Reviews, 11(3): 480-496. 1998.

GUBLER, D.J. & SATHE, R. **Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever**. In A Homma and JF Cunha, proceedings of the international symposium on yellow fever and dengue, pp 291-322. 1988.

GUY, B., ALMOND, J.W. **Towards a dengue vaccine**: Progress to date and remaining challenges. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 31(2-3):239-252. 2008.

GUZMAN, M.G. & KOURI, G. **Advances in dengue diagnosis**. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 3:621-627. 1996.

HALSTEAD, S. B. **Dengue**. Lancet 370(9599), 1644-52. 2007.

HEINZ, F.X., HOLZMANN, H., MANDL, C., GUIRAKHOO, F., WOLFGANG, T., KUNZ, C. **Molecular basis of antigenicity and attenuation of a Flavivirus**: Tick-borne encephalitis virus. Vaccine, 90: 97-100. 1990.

HENCHAL, E.A., PUTNAK, J.R. **The dengue viruses**. Clin. Microbiol. Rev., 3(4):376-396. 1990.

HUANG J., et al. **Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection**: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. Journal of Clinical Microbiology, 40 (5): 1840-1844. 2002.

KING, A., INNIS, B.L. & CAUDLE, L. **B-cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus**.Faseb J, 5, A9998. 1991.

KUNO, G., GOMEZ, I. & GUBLER, D.J. **Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 36:153-159. 1987.

LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: **FieldsVirology**, 4a ed, Vol I, Capítulo 32: 991-1041. David M. Knipe, Peter M Houley (eds), Philadelphia, Lippincott William & Wilkins. 2001.

LONG LI, S. M. L., YU, I. M., ZHANG, Y., KUHN, R. J., CHEN, J., ROSSMAN, M. G. **The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation.** Science. 319: 1830-1834. 2008.

LORENZ, I.C., ALLISON, S.L., HEINZ, F.X., HELENIUS, A. **Folding and dimerization of Tick-Borne Encephalitis virus envelope proteins prM and e in the endoplasmic reticulum.** J Virol. 76 (11): 5480- 5491. 2002.

MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nova York, 1989.

MANDL, C.W., GUIRAKOO, H., HOLZMANN, F.X., KUNZ, C. **Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using Tick-borne encephalitis virus as a model.** J. Virol., 156: 127-132. 1987.

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., HARRISON, S.C. **Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein.** J Virol.; 79: 1223–1231. 2005.

MONATH, T.P. **Dengue: The risk to develop and developing countries.** Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 2395-23400. 1999.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Dengue en las américas, programa regional de dengue.** Washington: PAHO. 2007.

REY, F. A., HEINZ, F. X., MANDL, C., KUNZ, C. & HARRISON, S. G.. **The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution.** Nature (London) 375:291–298. 1995.

ROEHRIG, J. T. Immunochemistry of the dengue viruses, p. 199–219. *In* D. J. Gubler and G. Kuno (ed.), **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** CAB International, New York, N.Y. 1997.

ROEHRIG, J. T., BOLIN, R. A. & KELLY, R. G.. **Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica.** *Virology*, 246:317–328. 1998.

RUSSELL, P.K., NISALAK, A. **Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test.** *Journal of Immunology* 99:291-296. 1967.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.Á. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science*, 239:487-491. 1998.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. de. **Proteínas recombinantes produzidas em leveduras.** *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, v. 12, p. 20-22, 2000.

ZHANG, W., CHIPMAN, P. R., CORVER, J., JONHSON, P., ZHANG, Y., MUKHOPADHYAY, S., BAKER, T. S., STRAUSS, J. H., ROSSMANN, M. G., KUHN, R. J. **Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus.** *Nature Structural Biology*, 10 (11): 907-912. 2003.

SANCHEZ, M.C.A. Testes sorológicos. In: **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes** 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SUGRUE, R.J. *et al.* **The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*.** *Journal Virology Methods*, v. 69, p. 159-167. 1997.

TAPIA-CONYER, R., MENDEZ-GALVAN, J.F., RINCON, H. **The growing burden of dengue in Latin America.** *Journal of Clinical Virology*, 46:53-56. 2009.

TISONE, T., CITEAU, H AND MCINTOSH, B. **In-line processing trends for lateral-flow immunoassay manufacturing.** *IVD Technology*. Jun; 13(5).

VALADÃO, A. L. C. **Construção e caracterização de vírus febre amarela (fa) 17d recombinantes expressando o domínio III da proteína e de dengue 2 na região intergênica e/ns1 do vírus fa 17d.** 2008. 135f. (Mestrado em Biologia Parasitária)– FIOCRUZ: Rio de Janeiro, 2008.

VALDÉS, I. *et al.* **Expression in *Pichia pastoris* and immunological evaluation of a truncated Dengue envelope protein.** *Molecular Biotechnology*, v. 35, p. 23-30, 2007.

VORDAM, V. and KUNO, G. **Laboratory diagnosis of dengue virus infections.** In DJ Guber and G Kuno (ed). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, Cab International, London, United Kingdom, pp 313-334. 1997.

WEI, H.; JIANG, L.; XUE, Y.; FANG, D.; GUO, H. **Secreted expression of Dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*.** *Journal of Virological Methods*, v. 109, p. 17-23, 2003.