

IAGO OLIVEIRA DE MELLO

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DO VÍRUS DENGUE EM
Komagataella phaffii PARA PADRONIZAÇÃO DE KITS DE DIAGNÓSTICOS**

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

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

Coorientador: Roberto Sousa Dias

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M527e
2022 Mello, Iago Oliveira de, 1993-
Expressão heteróloga de proteínas do vírus dengue em
Komagataella phaffii para padronização de kits de diagnósticos /
Iago Oliveira de Mello. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (48 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.
Referências bibliográficas: f. 43-48.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.185>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Dengue - Diagnóstico. 2. Antígenos. 3. Vírus da dengue.
4. Proteínas do envelope viral. 5. Expressão gênica. I. Paula,
Sérgio Oliveira de, 1976-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 616.91852075

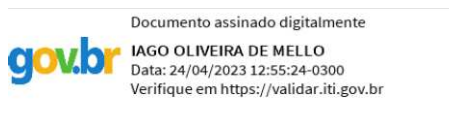
IAGO OLIVEIRA DE MELLO

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DO VÍRUS DENGUE EM
Komagataella phaffii PARA PADRONIZAÇÃO DE KITS DE DIAGNÓSTICOS**

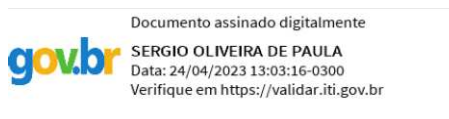
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de dezembro de 2022.

Assentimento:



Iago Oliveira de Mello
Autor



Sérgio Oliveira de Paula
Orientador

AGRADECIMENTOS

Graças damos sempre a Deus, o Grande Arquiteto Do Universo, pois por Tua bondade e misericórdia nos tem sido possível vencer as dificuldades interpostas em nossos caminhos. Que, para chegarmos ao êxito, que nossos corações e inteligência sejam sempre fortificados por Teu amor e bondade e necessário é que subjuguemos paixões e transigências.

Agradecer aos meus pais, Carlos e Jane, que incentivaram mesmo distantes, sempre estiveram transmitindo força, afeto, ânimo, me apoiando, se preocupando e me incentivando sempre a seguir em frente. A todos da família, que me motivaram e entenderam o motivo do distanciamento durante esses anos.

Ao meu orientador Sérgio, meu sinceros agradecimentos e admiração, por ter aberto as portas do laboratório, pela confiança e compreensão quando precisei. A todos os amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular – LIVM, que nesse tempo se tornaram minha família.

A ilustríssima instituição da Universidade Federal de Viçosa, excelência em Ensino, Pesquisa e Extensão, por meio do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, lugar onde realizei este mestrado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

E não poderia deixar de agradecer à cidade de Viçosa-MG, que me ajudou a crescer e me conhecer como pessoa e, além das dificuldades, também me proporcionou vários momentos felizes. Esta cidade a qual aprendi a chamar de lar, onde fiz amigos que se tornaram minha família quando estive longe de casa.

Vou sentir muita saudade. E estou feliz de poder chegar até aqui.

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de colher o que se plantou.”*

- Eclesiastes 3:1

BIOGRAFIA

Iago Oliveira de Mello, filho de Carlos José de Mello e Jane Vieira Oliveira de Mello, irmão de Igor Oliveira de Mello, Iury Oliveira de Mello e Iler Oliveira de Mello, nasceu em 14 de janeiro de 1993, na cidade de Pedro Canário, Espírito Santo – ES. Coursou o ensino fundamental no Centro Educacional União/Pedro Canário – ES, o ensino médio no Centro Educacional São Gotardo/São Mateus – ES, fez graduação em Farmácia na Universidade Federal do Espírito Santo – UFES/São Mateus, obtendo o título de Bacharel em Farmácia em agosto de 2019. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, nível mestrado acadêmico, da Universidade Federal de Viçosa-UFV/MG, submetendo-se à defesa de dissertação em 2022.

“Lembre-se do teu Criador nos dias da tua mocidade, antes que venham os maus dias e cheguem os anos em que dirás: não tenho neles prazer.”

- Eclesiastes 12:1

RESUMO

MELLO, Iago Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2022. **Expressão heteróloga de proteínas do vírus dengue em *Komagataella phaffii* para padronização de kits de diagnósticos.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientador: Roberto Sousa Dias

O diagnóstico preciso, confiável e diferencial na fase inicial da infecção pelo Vírus da Dengue (*DENV*) é fundamental diante do risco de agravamentos da doença. Os sintomas de cada paciente podem variar muito, indo desde uma doença autolimitada chamada Febre da Dengue (FD) ou Dengue Clássica (DC), até às formas mais severas, como a Febre da Dengue Hemorrágica (FDH) e a Síndrome de Choque da Dengue (SCD), variando dentro de um espectro contínuo onde muitos pacientes apresentam sintomas leves acabam não recebendo tratamento adequado e, muitas vezes, não recebem o diagnóstico de infecção. Com o objetivo de padronizar e formular um diagnóstico preciso e confiável, através da expressão de proteína em *K. Phaffi* para obtenção do domínio III da proteína estrutural E dos DENV-1 e DENV-4, em larga escala, capaz de identificar a fase inicial da infecção pelo vírus, sendo fundamental diante do risco de agravamentos da doença, com potencial risco de morte. Utilizamos um sistema de expressão heteróloga de proteínas, para expressão do domínio III da proteína estrutural E do DENV-2 e -4. Onde atualmente, os principais centros de pesquisa e diagnóstico do mundo têm apresentado dificuldades na obtenção de preparações com conteúdo adequado de antígeno, necessitando concentrar o antígeno através de centrifugação zonal contínua de sobrenadantes de culturas infectadas, uma vez que a produção do DENV em culturas celulares é relativamente baixa. Este quadro ratifica a existência do obstáculo importante, à produção de antígenos, a serem empregados em ensaios usados na captura do anticorpo presente no soro do paciente infectado. Nesse sentido, concluímos que o sistema heterólogos de expressão de proteínas mostrou-se promissores devido ao alto rendimento, integridade antigênica e custo reduzido para produção em escala e abrir caminhos para produção de testes diagnósticos menos onerosos.

Palavras-chave: Antígenos. Domínio III. Estrutural. Envelope.

ABSTRACT

MELLO, Iago Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2022. **Heterology expression of dengue virus proteins in *Komagataella phaffii* for standardization of diagnostic kits.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisor: Roberto Sousa Dias

Accurate, reliable and differential diagnosis in the initial phase of Dengue Virus (DENV) infection is essential given the risk of disease worsening. The symptoms of each patient can vary greatly, ranging from a self-limited illness called Dengue Fever (DF) or Classic Dengue (CD), to more severe forms such as Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (SCD), ranging within a continuous spectrum where many patients have mild symptoms end up not receiving adequate treatment and often do not receive the diagnosis of infection. With the objective of standardizing and formulating an accurate and reliable diagnosis, through the expression of protein in *K. Phaffii* to obtain domain III of the structural protein E of DENV-1 and DENV-4, on a large scale, capable of identifying the initial phase infection by the virus, which is essential given the risk of worsening the disease, with a potential risk of death. We used a heterologous protein expression system to express domain III of structural protein E of DENV-2 and -4. Where, currently, the main research and diagnostic centers in the world have had difficulties in obtaining preparations with adequate antigen content, requiring concentration of the antigen through continuous zonal centrifugation of infected culture supernatants, since the production of DENV in cell cultures is relatively low. This picture confirms the existence of an important obstacle to the production of antigens to be used in assays used to capture the antibody present in the serum of an infected patient. In this sense, we conclude that the heterologous protein expression system has shown to be promising due to the high yield, antigenic integrity and reduced cost for scale production and open ways for the production of less expensive diagnostic tests.

Keywords: Antigens. Domain III. Structural. Envelope.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Partícula viral do vírus dengue (VIRALZONE, 2019)	19
Figura 2 – Organização do genoma dos <i>Flavivirus</i> (VIRALZONE, 2019)	20
Figura 3 – Estrutura da proteína do envelope do DENV	22
Figura 4 – Mapa do vetor de expressão pPICZ α A (Invitrogen, EUA)	24
Figura 5 – Vetor de clonagem PUC57/DIIIIDENV2 (GenScript)	28
Figura 6 – Vetor de clonagem PUC57/DIIIIDENV4 (GenScript)	28
Figura 7 – Produto da digestão do PUC57/EDIIDENV-2 e -4	35
Figura 8 – Produto da digestão do plasmídeo pPICZ α A (Ivitrogen)	35
Figura 9 – PCR de colônia de bactérias <i>E.coli</i>	36
Figura 10 – Produto da reação de PCR do DNA genômico das leveduras <i>K. phaffii</i> transformadas com o vetor de expressão pPICZ α A/ EDIIDENV-2 e -4	36
Figura 11 – Gel de SDS-PAGE 12% do domínio III da proteína E.....	37
Figura 12 – <i>Western Blotting</i> para domínio III da proteína E de DENV2 e -4	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas estruturais e não estruturais do vírus dengue	20
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
ADA	Agravamento Dependente de Anticorpos
Ag	Antígeno
AOX	Álcool Oxidase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
D I	Domínio I
D II	Domínio II
D III	Domínio III
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Dengue Vírus-1
DENV-2	Dengue Vírus-2
DENV-3	Dengue Vírus-3
DENV-4	Dengue Vírus-4
FD	Febre da Dengue
FDB	Febre da Dengue Hemorrágica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
SCD	Síndrome de Choque da Dengue
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ES	Espírito Santo
FC	Fixação do Complemento
G	Gramas
GRAS	Generally Regarded As Safe
HCL	Ácido Clorídrico

IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IH	Inibição da Hemaglutinação
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LIVM	Laboratório de Imunovirologia Molecular
M	Molar
MAbs	Anticorpos Monoclonais
MAC-ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima de captura de anticorpo IgM
MG	Minas Gerais
MS	Ministério da Saúde
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
NaOH	Hidróxido de Sódio
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Par de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
TCA	Ácido tricloroacético
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFV	Universidade Federal de Viçosa
YPD	Extrato de Levedura - Peptona – Dextrose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 O <i>Dengue vírus</i>	18
2.1.1 Família <i>Flaviviridae</i>	18
2.1.2 Epidemiologia.....	18
2.1.3 Manifestações clínicas.....	19
2.1.4 Estrutura viral.....	19
2.1.5 Proteína E e Domínio III.....	21
2.1.6 Sistema de Expressão Heteróloga em <i>Komagataella phaffii</i>	22
2.1.7 Sistema de expressão <i>pPICZαA</i>	24
2.1.8 Diagnóstico.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Obtenção do gene otimizado do DIII da proteína E.....	28
4.2 Transformação da <i>E. coli</i> TOP10F competente com plasmídeo pUC57.....	29
4.3 Extração de DNA plasmidial.....	29
4.4 Clonagem do gene do DIII da proteína E de <i>DENV</i> no vetor de expressão pPICZαA.....	30
4.5 Confirmação de clonagem por PCR.....	30
4.6 Transformação por eletroporação da levedura <i>Komagataella phaffii</i> KM71.....	31
4.7 Cultivo da <i>Komagataella phaffii</i> para transformação.....	31
4.8 Transformação por eletroporação.....	31
4.9 Extração do DNA genômico das leveduras transformadas.....	32
4.10 Confirmação da transformação por PCR do DNA genômico das leveduras.....	32
4.11 Indução da expressão do DIII da proteína E de <i>DENV</i>	32
4.12 Purificação das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade.....	33
4.13 Análises por SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i> do DIII da proteína E purificadas.....	33
5. RESULTADOS.....	35
5.1 Ligação do gene do domínio III da proteína E do <i>DENV-2</i> e <i>-4</i> no vetor de expressão pPICZαA.....	35
5.2 Confirmação da transformação de leveduras <i>Komagataella phaffii</i> KM71H com o plasmídeo pPICZαA/EDIII DENV-2 e -4.....	36
5.3 Expressão do domínio III da proteína E de <i>DENV-2</i> e <i>-4</i>	37
6. DISCUSSÃO.....	39

7. CONCLUSÕES.....	41
8. PERSPECTIVAS.....	42
9. REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que mais de 4 bilhões de pessoas estejam vivendo em áreas com risco de infecção do vírus da dengue, que circula em mais de 128 países. Atualmente, ocorrem cerca de 400 milhões de infecções e 20 mil mortes causadas por este agente infeccioso (OMS, 2022). O 52º boletim epidemiológico de 2021 publicado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS) mostra que, no Brasil, no período de 3/1/2021 a 25/12/2021, foram registrados 534.743 casos, com uma incidência de 250,7 casos/100 mil habitantes. Destes casos, 370 foram de dengue grave (DG), 4.341 casos de dengue com sinais de alarme (DSA) e 241 óbitos confirmados. No atual ano, no período de 2/1/2022 a 7/05/2022, já foram registrados 757.068 casos prováveis de dengue, um aumento significativo de 151,4% de casos registrados no mesmo período analisado em 2021.

O vetor responsável pela transmissão do *Dengue vírus (DENV)* é o mosquito *Aedes aegypti*. Apesar de originalmente silvícola, o mosquito se adaptou aos ambientes urbanos a tal ponto de hoje ser este seu habitat. Entre os principais locais caracterizados como “criadouros” do mosquito destacam-se os recipientes e pontos de represamento de água. Ao contrário de outras espécies, o *A. aegypti* possui hábitos alimentares diurnos, com o período de maior chance das picadas ocorrendo especificamente no início da manhã e ao entardecer. A fêmea do *A. aegypti* pode picar várias pessoas durante um mesmo período de alimentação. Já o *Aedes albopictus* é um vetor secundário da dengue na Ásia, que se espalhou para a América do Norte e Europa. Assim como o *A. aegypti*, o *A. albopictus* é altamente adaptável, podendo, porém, sobreviver em regiões temperadas mais frias (BÄCK E LUNDKVIST, 2013).

No Brasil, o principal vetor da dengue é a fêmea do mosquito *A. aegypti*. Em outras regiões, o *DENV* é transmitido também pelas espécies *A. albopictus*, *A. polynesiensis* e *A. scutellaris*. Uma vez no hospedeiro mamífero, inicia-se o ciclo de replicação viral nas células estriadas, lisas, fibroblastos e linfonodos locais. Após um período de incubação de 2 a 10 dias, ocorre a viremia, com a disseminação do vírus no organismo do indivíduo. A infecção pode ser subclínica assintomática ou se manifestar clinicamente, indo desde uma doença autolimitada chamada Febre da Dengue (*DF*) ou Dengue Clássica, até às formas mais severas, como a Febre da Dengue Hemorrágica (*DHF*) e a Síndrome de Choque da Dengue (*DSS*), variando dentro de um espectro contínuo. Os fatores que determinam o quão brando ou severo serão os sintomas da infecção nos hospedeiros ainda permanecem obscuros. Apesar de a pessoa adquirir imunidade duradoura para aquele sorotipo que a infectou (DE PAULA E FONSECA, 2004), estudos apontam que infecções secundárias com sorotipos distintos são

um fator de risco para o desenvolvimento de formas mais graves da dengue, a *DHF* ou a *DSS* (RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010), aumentando ainda mais as complicações e riscos de morte (PATTERSON *et al.*, 2016).

O diagnóstico preciso, confiável, diferencial e na fase inicial (fase aguda) da infecção pelo *DENV* é fundamental diante do risco de agravamentos da doença, com potencial risco de morte. Os sintomas de cada paciente podem variar muito, indo de uma febre leve até uma febre hemorrágica. Muitos pacientes que apresentam sintomas leves acabam não recebendo tratamento adequado e, muitas vezes, não recebem o diagnóstico de infecção pelo *DENV*. Os antígenos usados para diagnóstico da dengue são proteínas virais estruturais, preparados a partir do cérebro de camundongos recém-nascidos infectados. Porém esta obtenção é extremamente laboriosa e cara (MARTINA *et al.*, 2009; MILLER, 2019). Nesse sentido, os sistemas heterólogos de expressão de proteínas são promissores para formulação de kit diagnóstico e testes de detecção rápida, devido ao alto rendimento, integridade antigênica e custo reduzido para produção em escala industrial (XISTO, 2020).

O desenvolvimento de uma vacina contra a dengue, que seja segura, eficaz e bem balanceada, tem se tornado uma propensa realidade e as futuras estratégias de vacinação devem se concentrar em obter imunidade protetora contra os quatro sorotipos. Essas vacinas estão sendo avaliadas quanto à eficácia clínica, uma vez que, a longo prazo, a sua segurança e eficácia podem mudar à medida que os níveis de anticorpos diminuem no organismo (MARTINEZ *et al.*, 2020). Assim, ainda são recomendadas medidas profiláticas para controlar os vetores, as quais não têm se mostrado eficazes. Experiências práticas apontam que a estratégia para se combater a dengue passa pelo desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos mais robustos e elaboração de vacinas. Estas tecnologias dependem da obtenção de antígenos da dengue em grande quantidade e alta especificidade. Atualmente, os principais centros de pesquisa e diagnóstico do mundo têm apresentado dificuldades na obtenção de preparações com conteúdo adequado de antígeno, necessitando concentrar o antígeno através de centrifugação zonal contínua de sobrenadantes de culturas infectadas, uma vez que a produção do *DENV* em culturas celulares é relativamente baixa. Este quadro ratifica a existência do obstáculo importante, à produção de antígenos, a serem empregados em ensaios usados na captura do anticorpo presente no soro do paciente infectado (WHO, 2022).

Com base no acima exposto, este trabalho visou a construção de leveduras recombinantes capazes de produzir antígenos em quantidade e qualidade, utilizando um sistema de expressão heteróloga de proteínas, para expressão do domínio III da proteína estrutural E do *DENV*-2 e -4, como estratégia para uma obtenção menos laboriosa e

padronizável independente da infecção viral, de forma a favorecer o estabelecimento de novas tecnologias no controle, monitoramento e combate da dengue.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O *Dengue vírus*

2.1.1 Família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* é composta por quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*, que são vírus esféricos e envelopados. Espécies importantes incluem: Vírus da Febre Amarela, Vírus da Dengue, Vírus Zika, Vírus da Encefalite Japonesa e Vírus do Nilo Ocidental. O material genético é uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA) de polaridade positiva, ou seja, o genoma viral tem a mesma orientação do RNA mensageiro (mRNA) da célula infectada (SIMMONDS, 2017). Com isso, o material genético pode servir como base para a síntese das proteínas virais, também chamado de RNA infeccioso. Dentre os *Flavivirus*, encontra-se um grupo que tem um comportamento muito específico em seu ciclo: os vírus transmitidos por artrópodes ou arbovírus, sendo eles de grande importância médica e para o campo da Saúde Pública (FRANCKI *et al.*, 1991). No quadro atual, as infecções causadas pelo *DENV* são as que assumem maior importância no nosso país. O *DENV* possui quatro sorotipos denominados *DENV-1*, *DENV-2*, *DENV-3*, e *DENV-4* e, após infecção, a imunidade adquirida de cada um dos sorotipos é duradoura (DE PAULA E FONSECA, 2004).

2.1.2 Epidemiologia

Durante os anos de 1960 e 1970, houve uma queda significativa dos casos de dengue nas Américas, devido à erradicação do mosquito *A. aegypti*, consequência das campanhas realizadas para prevenir a transmissão da febre amarela (GUBLER, 1989). Como as medidas utilizadas para o controle do vetor tiveram sucesso por pouco tempo, o mosquito transmissor foi reintroduzido nessas regiões, levando à circulação dos sorotipos do vírus, principalmente o *DENV-2*, seguido do *DENV-1* e *DENV-4* em países da América Latina e Caribe, no final da década de 70 e início dos anos 80 (ISTÚRIZ; GUBLER; BREA DEL CASTILLO, 2000). No Brasil, entre 1986 e 1987, surtos da doença foram relatados (FIGUEIREDO; CAVALCANTE; SIMÕES, 1990). A última epidemia grave relatada no Brasil consta no ano de 2015, quando houve 1,6 milhões de casos e 972 mortes.

O número de casos de dengue notificados à OMS aumentou mais de 8 vezes nas últimas duas décadas, passando de 505.430 casos em 2000 para mais de 2,4 milhões em 2010 e 5,2 milhões em 2019. O número de mortes registradas entre 2000 e 2015 aumentou de 960

para 4.032, que atinge principalmente a faixa etária mais jovem. O número total de casos aparentemente caiu durante 2020 e 2021, assim como o número de mortes relatadas. No entanto, os dados ainda não estão completos e a pandemia de COVID-19 também pode ter dificultado a notificação de casos em vários países. O alarmante aumento global no número de casos nas últimas duas décadas pode ser parcialmente explicado por mudanças na notificação nacional da dengue e nos procedimentos de notificação aos ministérios da saúde e à OMS (OMS, 2022).

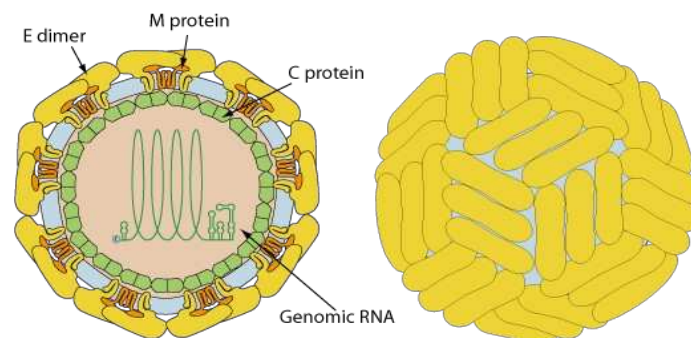
2.1.3 Manifestações clínicas

Embora a maioria dos casos de dengue seja assintomática, as manifestações clínicas podem variar desde um quadro simples na *DF*, como uma doença autolimitada, com sintomas leves, até um quadro grave e fatal como *DHF* e a *DSS* (GUZMAN; HARRIS, 2015). Os sintomas geralmente duram de 2 a 7 dias, seguindo um período de incubação de 4 a 10 dias após a picada de um mosquito infectado (BASURKO *et al.*, 2018). Após a infecção primária com um sorotipo do *DENV*, o risco de desenvolver as formas graves da doença é maior. (KIRKPATRICK *et al.*, 2016; SCHERWITZL; MONGKOLSAPAJA; SCREATON, 2017).

2.1.4 Estrutura viral

É um vírus envelopado, sua partícula viral (Figura 1) apresenta uma forma icosaédrica, variando sua medida entre 40 e 60 nm de diâmetro. Ela é composta por um ácido nucleico e pelas proteínas estruturais (C, prM/M e E) (CABEZAS *et al.*, 2005).

FIGURA 1 – Partícula viral do vírus dengue



FONTE: VIRALZONE, 2019.

O genoma viral é composto por uma molécula de RNA fita simples senso positivo, com cerca de 11kb, contendo uma única janela aberta de leitura (*ORF*), e é flanqueado por duas regiões não traduzidas 5' UTR e 3'UTR. A ORF codifica uma única poliproteína, sintetizada a partir do mRNA e clivada por enzimas celulares e virais para dar origem às três proteínas estruturais (C, prM, M e E) (Figura 2), que formam o capsídeo viral, e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5)(Figura 2) (LEITMEYER *et al.*, 1999).

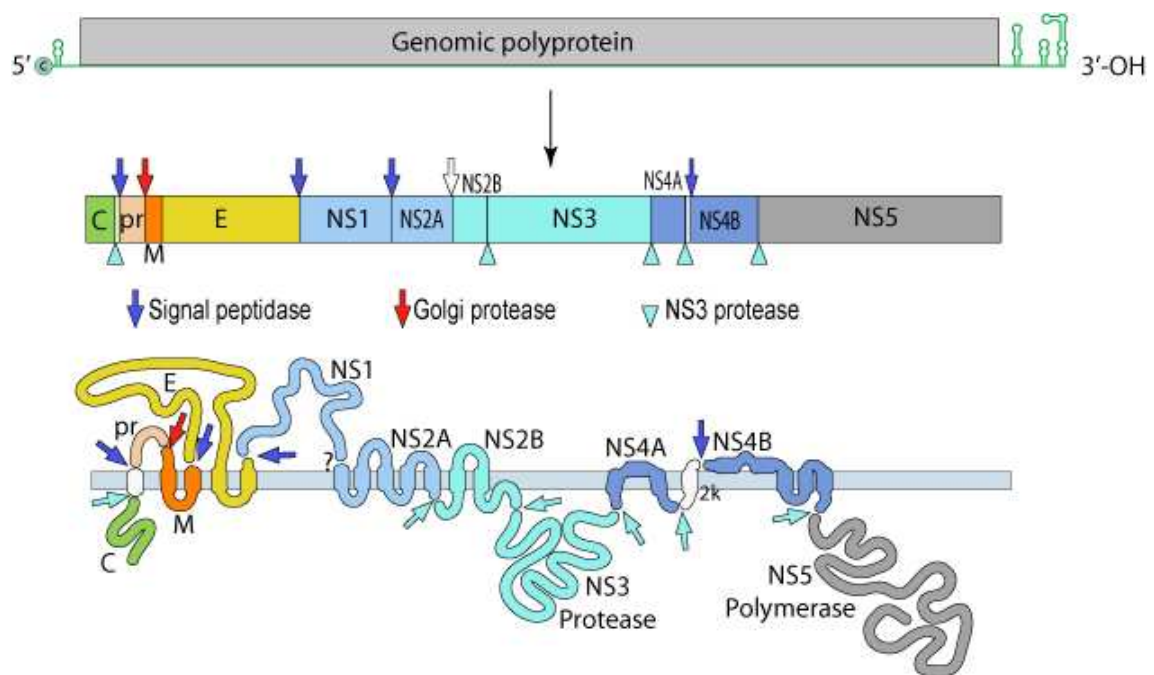


FIGURA 2 – Organização do genoma dos *Flavivirus* - C, prM, M e E - proteínas estruturais; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 - proteínas não estruturais. FONTE: VIRALZONE, 2019

A partícula viral é montada utilizando as proteínas estruturais, enquanto as proteínas não estruturais são usadas nos processos de síntese do RNA genômico viral e na tradução proteica que ocorre durante o ciclo de multiplicação viral (LINDENBACH; RICE, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1 – Proteínas estruturais e não estruturais do vírus dengue

Proteína	Tamanho	Subunidades	Funções
C	100 aminoácidos	-	Facilita a montagem do capsídeo
prM / M	21 kDa / 8 kDa	-	prM interage e estabiliza a proteína E.
E	53 kDa	-	Capacidade de ligação ao receptor celular
NS1	48 kDa	-	Cliva a junção NS1-NS2A envolvida nas etapas iniciais da replicação viral
NS2	22 kDa	NS2A, NS2B	NS2A desempenha um papel na síntese de RNA e maturação de vírion e como um ativador do processamento correto de NS1 NS2B atua como um ativador de NS3, permitindo seu funcionamento adequado
NS3	618 aminoácidos	-	Atua como uma protease quando combinado com NS2B. Funciona como uma RNA helicase e RTPase / NTPase
NS4	16 kDa	NS4A, NS4B	Desempenha um papel na curvatura da membrana e facilita as interações proteína-proteína
NS5	104 kDa	-	Essencial para a replicação e transcrição do genoma viral

Fonte: IDRIS; MUHARRAM; DIAH, 2016

2.1.5 Proteína E e Domínio III

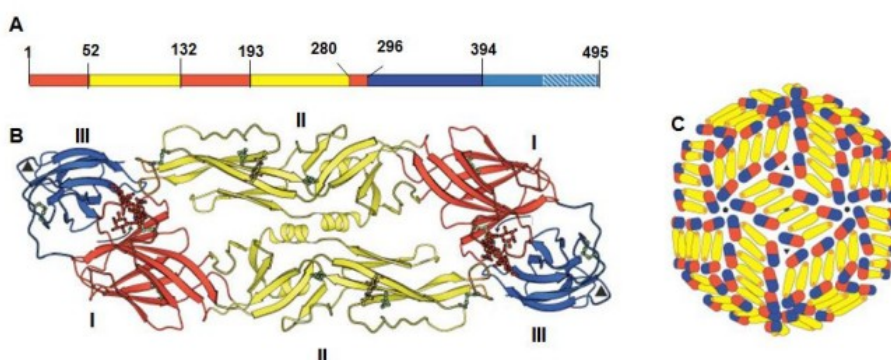
A proteína é composta por três ecto-domínios, uma haste proximal à membrana e uma âncora transmembrana (KLEIN *et al.*, 2013; RATHORE, *et al.*, 2020). Várias estruturas cristalinas mostraram que os ecto-domínios são arranjados em três dímeros antiparalelos, onde o ecto-domínio I (EI) está localizado no domínio central II (EDII) e III (EDIII), em dois sítios opostos em cada um dos monômeros de uma unidade dimérica (KUHN *et al.*, 2002; MODIS *et al.*, 2004; FIBRIANSAH *et al.*, 2015; RATHORE, *et al.*, 2020). As principais propriedades biológicas do *DENV* estão relacionadas à proteína E, que recobre totalmente a membrana e o genoma. A proteína E define o tropismo celular e a capacidade de hemaglutinar eritrócitos. Há alguma variação na composição da proteína E entre os *DENV*, inclusive nos epítomos. Esses constituem antígenos de superfície que determinam a resposta imune e a proteção contra o *DENV* em seres humanos.

Os anticorpos direcionados à proteína E, determinam a imunidade protetora mais longa. (BRICKS, 2004). Essa proteína apresenta três domínios estruturais (Figura 3): o domínio I (DI) ou domínio central, possui aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos e contém principalmente um tipo específico de epítipo não neutralizante, o que o torna uma região de "dobradiça" molecular envolvida em alterações conformacionais desencadeadas pelo baixo pH; domínio II (DII), ou domínio de dimerização de proteínas, representa a interface entre os outros dois domínios e está envolvido na fusão de membrana mediada por vírus, além disso, contém muitos epítomos de reação cruzada, gerando 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.

A proteína E contém múltiplos tipos e subtipos específicos de epítomos que geram somente a neutralização viral por MAb e têm sido hipoteticamente aquele que contém o local de ligação da célula hospedeira ao receptor (REY *et al.*, 1995; ROEHRIG *et al.*, 1998), uma vez que os epítomos do DIII são comprovadamente mais imunogênicos para a produção de anticorpos (WAYNE D. CRILL, JOHN T. ROEHRIG, 2001). A proteína E tem sido um dos principais alvos no estudo de vacinas e no uso como antígeno no diagnóstico de uma infecção por DENV (SUGRUE *et al.*, 1997).

FIGURA 3 – Estrutura da proteína do envelope do *DENV*.



A - Ectodomínio do vírus da dengue: domínio I (vermelho), domínio II (amarelo) e domínio III (azul). B – Estrutura dimérica da proteína E. Essa conformação da proteína E solúvel está presente na partícula viral madura. C - Proteína E na superfície do vírus, organizada em 90 dímeros de forma icosaédrica.

FONTE: Figura adaptada de Modis *et. al.*, 2004.

Desta forma, essa proteína estrutural, presente na superfície do vírus, é utilizada para desenvolver respostas imunes devido à produção de anticorpos, sendo assim uma possível proteína para uso diagnóstico.

2.1.6 Sistema de Expressão Heteróloga em *Komagataella phaffii*

A *Komagataella phaffii* uma levedura haploide e metilotrófica, apresenta vantagens em relação ao sistema de expressão, em relação ao seu sistema genético de fácil manipulação

e ao seu crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples, que permite sua expansão para a produção de proteínas em escalas industriais, capazes de usar compostos redutores de um carbono, como metanol ou metano, como fonte de carbono para seu crescimento, onde a primeira cepa já atribuída à espécie *P. pastoris* foi isolada por Alexandre Guilliermond do exsudato de uma castanheira francesa em 1919 e foi originalmente chamada de *Zygosaccharomyces pastori* (GUILLIERMOND, 1920). Na década de 1950, Herman Phaff isolou outras cepas de árvores de carvalho preto na Califórnia, Estados Unidos, e renomeou a espécie para *Pichia pastoris* (PHAFF et al., 1956). No entanto, em 1995, novos estudos gerados pelo sequenciamento do RNA ribossômico fizeram com que todas as cepas de *P. pastoris* fossem movidas para um novo gênero, *Komagataella* (YAMADA et al., 1995), e posteriormente separadas em duas espécies (KURTZMAN, 2009) *Komagataella pastoris* (que inclui a cepa francesa) e *K. phaffii*.

Nos sistemas de expressão heterólogos descritos na literatura em detrimento de outros sistemas de expressão devido à sua facilidade de manipulação genética, expressão de alto nível de proteínas heterólogas, promoção de O- e N-glicosilação e processamento de sinal rápido, fácil e econômico (CREGG et al., 2000; AHMAD et al., 2014; RODRIGUES et al., 2020), uma das leveduras mais utilizadas é do gênero *Komagataella*. Por exemplo, espécies de *K. phaffii* para a produção de diversos metabólitos e proteínas de interesse biotecnológico (ROMANOS et al., 2013). Ao comparar sistemas de expressão desenvolvidos em procariontes e eucariotos, essas leveduras se destacam pela facilidade de cultivo, crescimento, manutenção e facilidade de manipulação genética. Neste caso em particular, é fundamental que o perfil bioquímico deste organismo tenha um padrão específico de modificações pós-traducionais semelhantes aos mamíferos, muitas vezes necessário para obter produtos biotecnológicos ativos ou adequadamente processados. Os sistemas de expressão de levedura são econômicos, geralmente têm melhores rendimentos e requerem menos tempo e esforço em comparação com outros sistemas de expressão eucariótica, como *Baculovírus* e células de mamíferos (CREGG, HIGGINS, 1995).

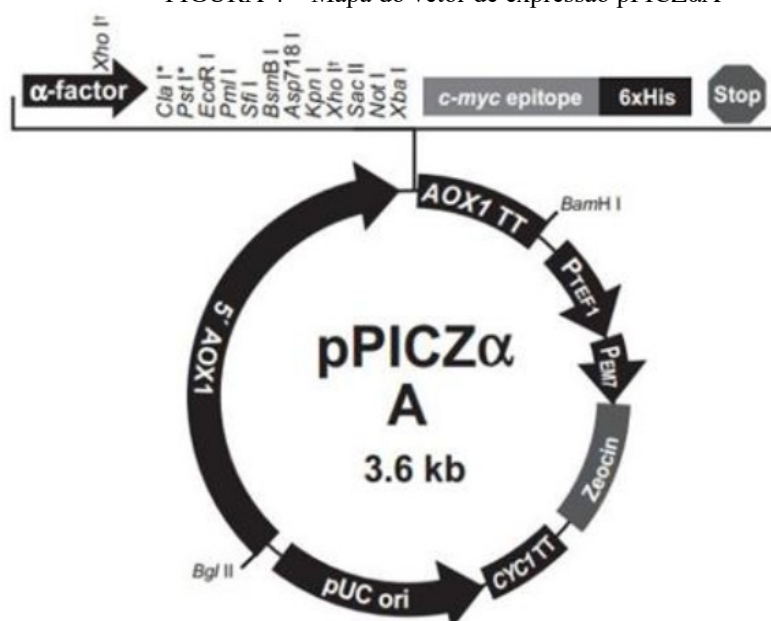
O sistema eucarioto *K. phaffii*, amplamente utilizado na biotecnologia, tem a capacidade de produzir a maior parte das proteínas recombinantes de forma estável e com modificações pós-traducionais características de proteínas eucarióticas (COLAO et al., 2006). A escolha deste organismo como sistema de expressão heteróloga se justifica, além das características citadas acima, pelo fato dessa levedura apresentar o status GRAS (“*Generally Recognized As Safe*”), bem como sua capacidade de converter entre 30% e 40% do seu peso

em proteínas (RATNER, 1989) e enfaticamente ao fato desta levedura glicosilar proteínas de forma mais próxima aos mamíferos, cerca de 8-14 resíduos de manose em cadeias de oligossacarídeos (GRINNA, TSHOOP, 1989).

2.1.7 Sistema de expressão *pPICZαA*

Os plasmídeos de expressões *pPICZαA* (Figura 4), para transformar *K. phaffii*, 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 nessa célula, como a enzima Álcool Oxidase (AOX), podendo chegar a níveis acima de 30% de toda proteína celular, mas, por outro lado, essas enzimas não são detectáveis quando alimentadas por outra fonte de carbono (CEREGUINO, CREGG, 2000; GELLISEN, 2000; TEIXEIRA et al, 2020; XISTO et al, 2020).

FIGURA 4 – Mapa do vetor de expressão *pPICZαA*



FONTE: Invitrogen, EUA

Logo, esses vetores utilizados para a transformação da *K. phaffii* são beneficiados com a repressão exercida sobre os genes *AOX* e na facilidade de induzi-los, com metanol. Desta forma, permitem que altas densidades celulares sejam obtidas e, assim, altas concentrações de proteínas heterólogas produzidas, sem que níveis tóxicos sejam expressos (GELLISEN, 2000). Sendo esses vetores utilizados para a geração de recombinantes, integrados no genoma,

de forma randômica ou recombinação homóloga, garantem maior estabilidade do inserto (GEREGHINO, GREGG, 2000).

Esse sistema de expressão heteróloga, em *K. phaffii*, é utilizado em diversas áreas de interesse médico ou veterinário, já descritos na literatura, inclusive em proteínas estruturais ou não- estruturais do vírus da Dengue (SUGRUE et al, 1997; BISHT et al, 2001; WEI et al, 2003; VALDÉS et al, 2007; OLIVEIRA, 2011; PAIXÃO, 2014; PRATES, 2017; TEIXEIRA et al, 2020) demonstrando que essa levedura pode ser um recurso para expressão de proteínas de forma segura, barata e de larga escala, possibilitando o uso em kits diagnósticos.

2.1.8 Diagnóstico

A infecção pelo *DENV* tem sido diagnosticada pela 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 têm sido usados para diagnóstico da infecção por dengue: Inibição da Hemaglutinação (IH), Fixação do Complemento (FC), Teste de Neutralização (TN), ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tipo captura e sanduíche (DE PAULA, FONSECA, 2004).

Os testes rápidos por imunocromatografia 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 ensaio é extremamente atrativo para clínicas e unidades básicas de saúde (Estratégia de Saúde da Família), consultórios médicos, salas de emergência, pequenos hospitais e instalações mais isoladas. 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).

O teste sorológico TN é o teste mais específico para o *DENV* e pode ser detectado por um longo período, de fato, durante toda a vida de uma pessoa infectada. Devido à sua alta especificidade, a TN pode ser usada para identificar sorotipos infecciosos em infecções primárias por dengue, ou seja, devido às respostas monotípicas relativas observadas em soros de pacientes em fase de convalescência (GUBLER, SATHE, 1988; VORDAM, KUNO, 1997).

Os métodos ELISA baseados em sistemas imunoenzimáticos são considerados muito úteis para o diagnóstico da dengue devido à sua alta sensibilidade e rapidez. É derivado da investigação de diferentes anticorpos, nomeadamente a investigação da fase aguda (IgM) e da fase convalescente (IgG), e a investigação do antígeno (Ag). Esses testes tornaram-se os

métodos sorológicos mais utilizados para o diagnóstico da dengue nos últimos anos, devido à sua simplicidade de execução e não exigir equipamentos muito complexos. Além disso, por serem muito sensíveis para o diagnóstico de anticorpos de fase aguda, dispensam a necessidade de uma amostra pareada no período de convalescença (GUBLER, SATHE, 1988; VORDAM, KUNO; 1997).

O MAC-ELISA (*IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*) tem sido uma ferramenta inestimável para o monitoramento da dengue clássica e da dengue hemorrágica. Em áreas onde a dengue não é endêmica, esse método pode ser usado para detectar clinicamente até mesmo casos aleatórios com sinais de infecção viral. Uma vantagem do MAC-ELISA durante epidemias é a rápida determinação da propagação da transmissão. O MAC-ELISA, em áreas onde a dengue é endêmica, pode ser usado como um importante meio na avaliação de muitas amostras laboratoriais com relativa facilidade (GUBLER, SATHER, 1988).

O IgG-ELISA tem sido usado para diferenciar entre infecção primária e secundária por dengue (CHUNG *et al.*, 1989). O teste é simples e fácil de realizar e pode ser utilizado para a análise de muitas amostras. O IgG-ELISA não é muito específico, reage de forma cruzada com outros *Flavivirus* e não pode ser usado para identificar sorotipos do vírus da dengue (GUBLER, 1998). Atualmente, o maior desafio para o desenvolvimento de imunoenaios enzimáticos envolve a aquisição de antígenos. Centros de pesquisa e diagnóstico em todo o mundo têm apontado um importante obstáculo para a produção em larga escala de antígenos. Uma delas é a concentração, que é utilizada em diversos testes para capturar anticorpos presentes no soro de pacientes infectados. No Brasil, os antígenos atualmente utilizados para diagnosticar a dengue são proteínas virais estruturais preparadas a partir de cérebros de camundongos neonatais infectados artificialmente, cuja obtenção é extremamente trabalhosa e cara. (MARTINA *et al.*, 2009; MILLER, 2019).

A obtenção de testes diagnósticos rápidos e baratos representa uma necessidade crescente no Brasil, possibilitando a realização de diagnósticos em larga escala em todo o país, mesmo em áreas mais distantes das grandes cidades. (PAHO, 2019).

Neste trabalho, utilizou-se o sistema PichiaPink TM (Invitrogen, USA), que é baseado nos sistemas de expressão em uma cepa mutante de *K. phaffii*, de forma a obter um antígeno em quantidade e qualidade para a expressão do domínio III da proteína estrutural E do DENV-2 e -4, através de um sistema de expressão heteróloga de proteínas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Construção de linhagens recombinantes em *K. phaffii* capazes de fornecer antígeno do Domínio III da proteína do envelope (E) do *DENV* -2 e -4, para potencial teste diagnóstico

3.2 Objetivos específicos

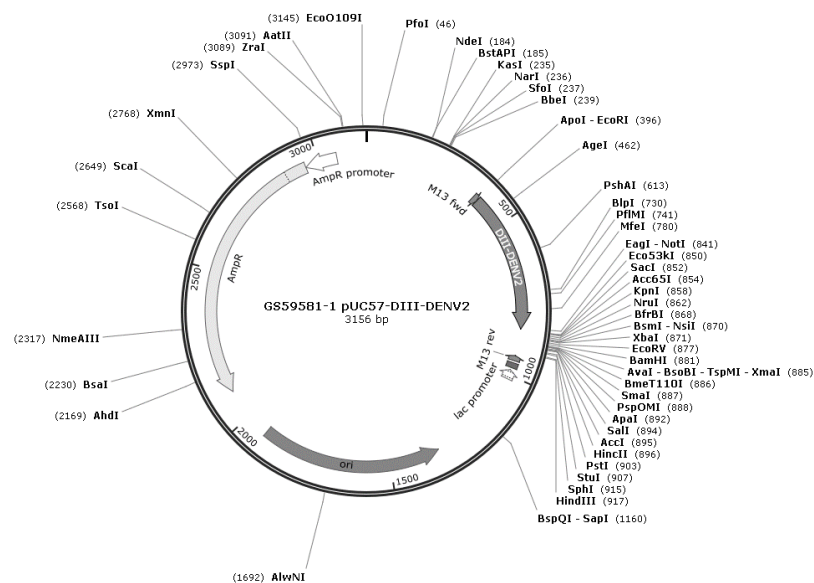
- Obter o gene do domínio III;
- Transformar *Escherichia Coli* TOP10F;
- Clonar o gene no vetor de expressão;
- Transformar da levedura *K. phaffii* KM71;
- Confirmação da presença do genoma da levedura;
- Expressar a proteína do domínio III;
- Analisar antigenicidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do gene otimizado do DIII da proteína E

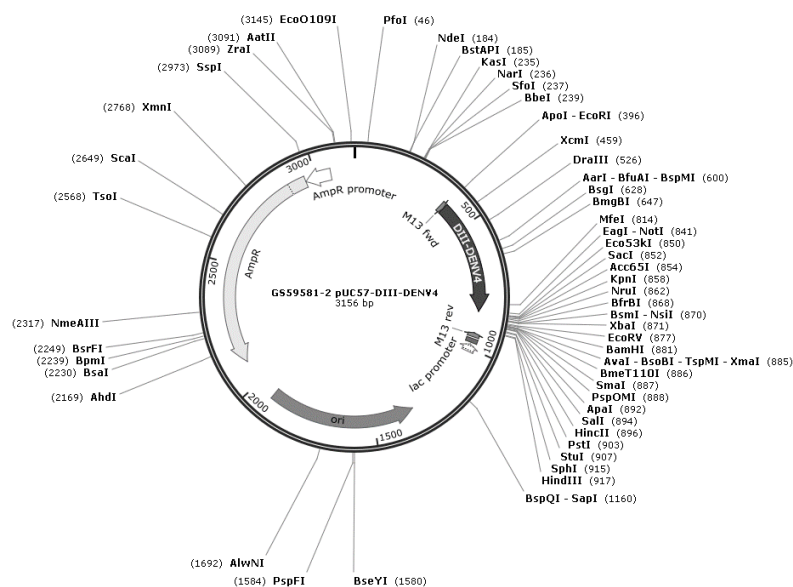
A sequência do DIII do gene da proteína E do *DENV* no vetor de clonagem pUC57 foi sintetizada pela empresa GenScript, originando o plasmídeo pUC57/DIIIIDENV2 (Figura 5) e pUC57/DIIIIDENV4 (Figura 6) para respectivo sorotipo de *DENV*-2 e -4.

FIGURA 5 – Vetor de clonagem PUC57/DIIIIDENV2



FONTE: GenScript

FIGURA 6 – Vetor de clonagem PUC57/DIIIIDENV4



FONTE: GenScript

4.2 Transformação da *E. coli* TOP10F competente com plasmídeo pUC57

Foram transformadas por choque térmico as células de *E. coli* TOP 10F competentes com o plasmídeo pUC57/EDIIDENV-2 e -4, com o objetivo de aumentar o número de cópias dos plasmídeos recombinantes e formar um estoque dos mesmos. Desta forma, foram adicionados 2 µL da solução de plasmídeo recombinante ao tubo contendo 200 µL das bactérias *E. coli* TOP10F competentes, e incubado por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, foi incubada a mistura a 42°C por 1 minuto e, após esse tempo, transferido para 4°C, quando permaneceu incubado por 15 minutos, obtendo o choque térmico. Em seguida, foram adicionados 110 µL de meio SOC (20 g/L de bacto triptose, 5 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de NaCl e 20mM de glicose) e incubados a 37°C por 30 minutos, sob agitação de 150 rpm. Finalizando, foi realizado o plaqueamento das bactérias transformadas em meio LB sólido contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/mL) a 37°C, até o aparecimento das colônias. As colônias foram transferidas, para 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL), foi incubado a 37°C, por aproximadamente 12 horas, sob agitação de 180 rpm. Após esse procedimento, as bactérias foram estocadas a -80°C, com 50% de glicerol.

4.3 Extração de DNA plasmidial

Foram submetidas a uma extração de DNA plasmidial as bactérias *E. coli* TOP10F transformadas com o plasmídeo pUC57/EDIIDENV-2 e -4, pelo método de lise alcalina. Desta forma, foram inoculadas 100 µL das bactérias em 10 mL de meio LB líquido com o antibiótico ampicilina (100 µg/mL). Essas bactérias foram incubadas a 37°C, por 18 horas, sob agitação de 180 rpm. Foi realizada uma centrifugação da cultura a 10.000 xg por 2 min, e o sobrenadante foi descartado. Logo após, o sedimento obtido foi suspenso em 200 µL de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM), e adicionado 360 µL de solução alcalina fresca (NaOH 0,2 M, SDS 1%). A solução foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionados 300 µL de solução de acetato de potássio e ácido acético glacial (Acetato de potássio 5 M, Ácido acético glacial 100%). Após esse procedimento, a solução foi centrifugada a 10.000 xg por 5 minutos, e transferido o sobrenadante para um novo tubo. Foram adicionados 750 µL de isopropanol a esse sobrenadante e realizada uma nova centrifugação a 10.000 xg por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado suspenso em 200 µL de tampão TE + RNase (100 µg/mL). Foi incubado por 30 minutos a 37°C e, após, foram adicionados 110 µL de acetato de amônia 7,5 M, misturado vigorosamente. A solução foi centrifugada a 10.000 xg por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 750 µL de etanol 100% e

centrifugado a 10.00 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com etanol 70%. Por fim, foi realizada uma centrifugação final a 10.00 x g, por 2 minutos, descartando o sobrenadante e o precipitado seco e suspenso em 30 µL de água pura estéril.

4.4 Clonagem do gene do DIII da proteína E de *DENV* no vetor de expressão pPICZαA

A transferência das regiões codificadoras do DIII da proteína E para o vetor de expressão pPICZαA foi realizada pela clivagem dos plasmídeos pUC57/EDIIIIDENV-2 e -4 com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (Promega), conforme instruções do fabricante. O fragmento contendo a região de interesse foi purificado utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) e clonado no vetor de expressão pPICZαA, previamente linearizado também com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (Promega). A reação de ligação entre o inserto e o vetor foi realizada pela enzima T4 ligase (Sigma), e o produto da ligação utilizado para transformar bactérias *E. coli* TOP10F competentes, por choque térmico. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas pela técnica de "*spread plate*" em meio LB com baixa concentração de sal (0,5 % NaCl), contendo 25 µg/mL do antibiótico zeocin, e incubadas a 37°C por cerca de 18 horas. Para a confirmação da ligação entre o inserto e o vetor, foi realizada PCR de colônia, seguida da extração de DNA plasmidial e reação de digestão dupla com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (Promega).

4.5 Confirmação de clonagem por PCR

As colônias das bactérias transformadas que cresceram no meio LB sólido foram transferidas, uma a uma, para 5 mL de meio LB líquido com antibiótico zeocin (25 µg/mL), incubadas a 37°C por cerca de 12 horas, sob agitação de 180 rpm. Para a reação de PCR, utilizaram-se 3 µL da cultura, 0,4 mM de cada primers *AOXI* (IDT) (Sense: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC e Antisense (AS) 5'-GGCAATGGCATTCTGACATCC), para a região *AOXI* do plasmídeo pPICZαA (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Promega). Em seguida, realizou-se um ciclo de aquecimento inicial a 94°C, seguido de 25 ciclos a 94°C para desnaturação da fita de DNA, 55°C para o anelamento dos primers, 72°C para a extensão da fita, e um ciclo final de 7 minutos também a 72°C.

4.6 Transformação por eletroporação da levedura *Komagataella phaffii* KM71

Foram submetidos a uma reação de restrição com a enzima *Sac I* (Promega), o vetor de expressão pPICZ α A clonado com o gene EDIIIIDENV-2 e -4, precipitado com NaCl 5 M, e utilizado para transformar leveduras *K. phaffii* KM71 pelo método de eletroporação, seguindo os parâmetros descritos para *Saccharomyces cerevisiae* (2500V, 25 μ F, 200 Ω).

4.7 Cultivo da *Komagataella phaffii* para transformação

Foram cultivados 100 μ L da levedura *Komagataella phaffii* KM71 eletrocompetente em 5 mL de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), por 24 horas, a 30°C, sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, foram transferidos 500 μ L do pré-inóculo para 500 mL de meio YPD, e incubado novamente a 30°C, por cerca de 19 horas (DO 1,3-1,5). Quando a DO apropriada foi atingida, a cultura foi centrifugada a 1500 $\times$ g, 4°C, por 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e as células obtidas foram suspensas em 300 mL de água gelada estéril, novamente submetidas a centrifugação. Foi descartado o sobrenadante e as células foram suspensas em 150 mL de água estéril gelada. Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições anteriores, descartado o sobrenadante, e as células foram suspensas em 12 mL de água com Sorbitol 1 M gelada. Por fim, foi efetuada uma nova centrifugação das células a 1500 $\times$ g, 4°C, por 5 minutos. Descartado o sobrenadante, as células foram suspensas em 700 μ L de água com sorbitol 1 M e mantidas no gelo.

4.8 Transformação por eletroporação

Foram misturadas separadamente cerca de 10 μ g do plasmídeo pPICZ α A/EDIIIIDENV-2 e -4 linearizado, 80 μ L das células de *K. phaffii* KM71 eletrocompetentes para a transformação. Foi transferida a mistura para a cubeta de eletroporação e incubada no gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram pulsadas seguindo os parâmetros descritos para *Saccharomyces cerevisiae*. Imediatamente, foi adicionado 1 mL de água com Sorbitol (1M) na cubeta, homogeneizado levemente e transferido todo o volume para um novo tubo. O volume foi incubado a 30°C, durante 2 horas, sem agitação. As leveduras foram plaqueadas em meio YPDS sólido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose, sorbitol (1M), 2% de ágar), contendo o antibiótico zeocin (100 μ g/mL). Cerca de 5 dias depois, as colônias obtidas foram transferidas, uma a uma, para o meio YPD líquido com 50 % de glicerol e estocadas a 80°C.

4.9 Extração do DNA genômico das leveduras transformadas

Foi cultivado, em meio YPD líquido, um dos clones das leveduras transformadas e estocadas, com o objetivo de extrair o DNA genômico, o qual posteriormente foi submetido à reação de PCR para a confirmação da transformação da levedura com o plasmídeo pPICZ α A/EDIIDENV-2 e -4. Para a extração do DNA genômico, foi cultivado 100 μ L de *K. phaffii* transformada em 5 mL de meio YPD líquido, por 24 horas, a 30°C sob agitação de 200 rpm. Após esse período, foi realizada uma centrifugação da cultura por 5 minutos, a 6.300 xg. Foi descartado o sobrenadante e as células obtidas foram suspensas em 400 μ L de tampão de extração (Triton 100 X, SDS 10%, NaCl 1 M, Tris-Hcl 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M pH 8,0) mais 0,3 g de “beads”. Foi agitado vigorosamente por 2 minutos para romper as células, e centrifugado por 10 minutos, 6.300 xg. Em seguida, foi transferido o sobrenadante para um novo tubo e adicionado 200 μ L de fenol-clorofórmio (100 μ L de fenol, 96 μ L de clorofórmio e 4 μ L de álcool isopropílico). Foi centrifugado por 10 minutos, 6.300 xg. Foi coletada a fase superior e transferida para um novo tubo. Realizada, em seguida, uma precipitação com 1/10 do volume de acetato de potássio 5 M e 2 volumes de etanol gelado. Foi deixado em temperatura ambiente por 2 minutos. Logo após, foi centrifugado por 5 minutos a 6.300 xg, descartou o sobrenadante e lavou as células com etanol 70%. Finalmente, foi centrifugado por 5 minutos a 6.300 xg, descartado o sobrenadante e deixando o DNA secar. O DNA foi então suspenso em 20 μ L de tampão TE, mais RNase, e incubado por 30 minutos a 37°C.

4.10 Confirmação da transformação por PCR do DNA genômico das leveduras

Foram submetidos a uma reação de PCR o DNA genômico das leveduras *K. phaffii* KM71 transformadas, utilizando oligonucleotídeos específicos para a região de *AOX1* dos plasmídeos pPICZ α A/EDIIDENV-2 e 4. A reação foi realizada nas mesmas condições descritas em 3.3.5, com exceção da quantidade de DNA utilizada, que aqui foi cerca de 1 μ g.

4.11 Indução da expressão do DIII da proteína E de *DENV*

Clones das leveduras positivas confirmadas por PCR foram submetidos a experimentos de indução para expressar o DIII da proteína E. Desta forma, foi realizado um pré-inóculo de 50 μ L das leveduras, que foram inoculadas em 5mL de meio YPD e mantidas por 24 horas a 30°C, 270 rpm de agitação orbital, até atingir uma DO_{600nm} de aproximadamente 2 – 2,5. Este pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de meio BMG (1,34% de base nitrogenada de levedura; 0,002% de biotina; fosfato de sódio 100 mM; 1% de glicerol

e 0,004% de histidina) com pH 6,0. Esta cultura foi deixada sob 270 rpm de agitação, a 30°C durante aproximadamente 3 dias, até atingir uma DO_{600nm} de aproximadamente 20. Crescida até este estado, a cultura foi submetida a centrifugação de 3.000 xg por 5 minutos, foi descartado o sobrenadante e as células obtidas foram suspensas em 300 mL de água gelada estéril, novamente submetidas a centrifugação. Foi descartado o sobrenadante e as células foram suspensas em 150 mL de água estéril gelada. Foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, descartado o sobrenadante e as células foram suspensas em água gelada estéril em um volume ideal para uma DO_{600nm} de aproximadamente 120 e diluído em meio BMM a pH 6,0 (1,34% de base nitrogenada de levedura; 0,002% de biotina; 100 mM fosfato de sódio; 1% de metanol e 0,004% de histidina) para uma DO_{600nm} de aproximadamente 60, para se induzir a expressão da proteína com metanol. A indução foi mantida durante 72 horas, sob as condições de 270 rpm e 20°C. O metanol foi adicionado à cultura para uma concentração final de 2% (v/v) em intervalos de 12 horas, por 3 dias. Terminado o período de indução, a cultura foi submetida a centrifugação e o sobrenadante foi recolhido e diluído com volume igual de tampão de ligação (Fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM), pH 7,4 e clarificado sob filtração a vácuo em membrana de 0,45 µm.

4.12 Purificação das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade

Através da cromatografia de afinidade, foram realizadas as purificações das proteínas, utilizando coluna His Trap FF de 5 mL acoplada ao sistema de purificação AKTA Prime Plus. Primeiramente, a coluna foi equilibrada com cerca de 7 mL de tampão de ligação e, posteriormente, as amostras foram submetidas a purificação. Um volume do tampão de ligação correspondente a 7 vezes o volume da coluna foi passado através da mesma com o objetivo de remover proteínas que interagiram de maneira não específica com a coluna. As proteínas ligadas especificamente na coluna foram coletadas por meio da aplicação de tampão de eluição (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl e 300 mM de imidazol) e as frações que apresentaram valores maiores de absorbância a 280 nm foram precipitadas com TCA (Ácido tricloroacético) 10%, suspensas em Tris-HCL 1,5 M pH 8,8, armazenadas a -80°C até a realização dos testes.

4.13 Análises por SDS-PAGE e *Western Blotting* do DIII da proteína E purificadas

O DIII da proteína-E purificadas do vírus *DENV-2* e -4 foram avaliadas inicialmente por SDS-PAGE 12%. Posteriormente, elas foram submetidas ao teste de *Western Blotting*

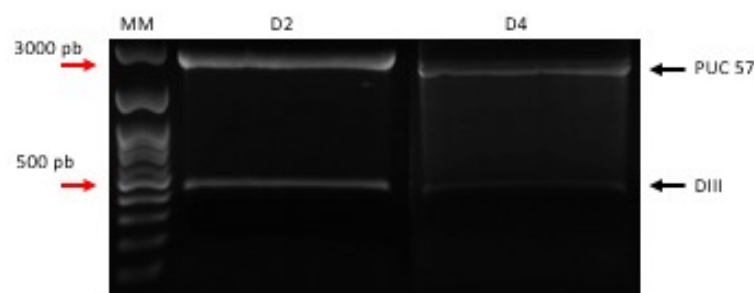
para confirmação. Para esse teste, as proteínas foram separadas eletroforicamente e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Foi realizado um bloqueio da membrana com gelatina 3% por 1 hora, a temperatura ambiente. Logo após, lavagens foram realizadas com tampão PBS-Tween 20 0,5%, e as proteínas adsorvidas a membrana foram incubadas *overnight* com anticorpo monoclonal Anti-polyHistidine (Sigma) diluído 1:3000. Foram realizadas lavagens com tampão PBS-T, e foi feita uma nova incubação de 2 horas com anticorpo secundário anti-IgG Camundongo (Sigma) diluído 1:80000. Esse anticorpo secundário é conjugado com a enzima peroxidase, a qual possui o p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP)(Sigma) como substrato, adicionado para revelar a reação.

5. RESULTADOS

5.1 Ligação do gene do domínio III da proteína E do *DENV-2* e *-4* no vetor de expressão pPICZαA

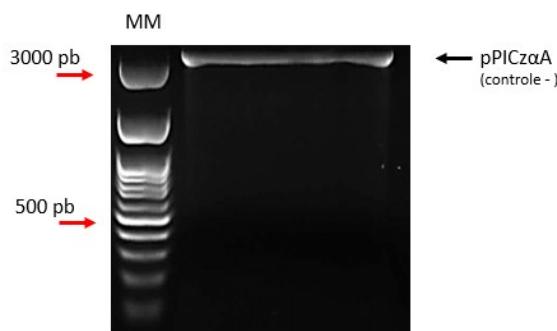
Foi possível verificar, por meio do produto de digestão e análise em gel de agarose 1%, a existência do vetor PUC57 com, aproximadamente, 3000 pb e à banda do inserto de interesse na altura de 500 pb (Figura 7). Assim, por digestão enzimática, foi possível confirmar a ocorrência da digestão nos sítios de restrição.

FIGURA 7 – Produto da digestão do PUC57/EDIIIIDENV-2 e -4, em gel de agarose 1%. MM-Marcador de peso molecular de 100 bp (KASVI); 1-Plasmídeo PUC57/EDIIID2 e D4 digerido com *EcoRI* e *NotI*.



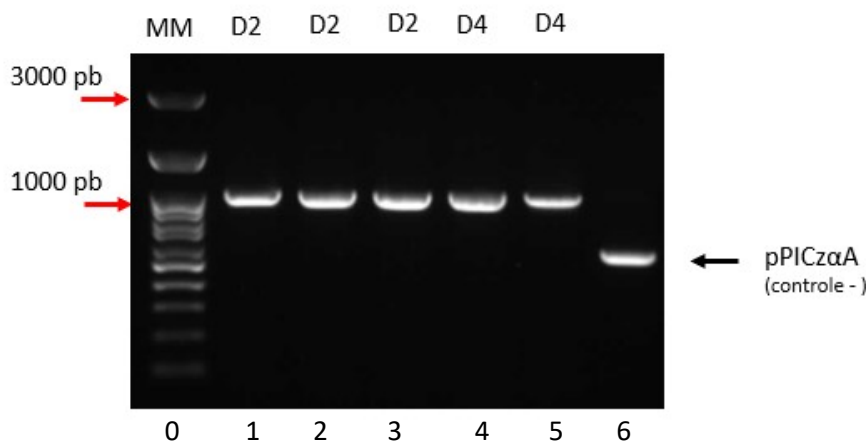
De forma a obter de um controle negativo, o vetor de expressão pPICZαA também foi submetido a uma reação de linearização com as enzimas podendo-se observar no gel de agarose um fragmento maior que 3000 pb, tamanho esperado para esse vetor, que possui 3600 pb (Figura 8).

FIGURA 8 – Produto da digestão do plasmídeo pPICZαA (Ivitrogen) com *EcoRI* e *NotI*. MM- Marcador de peso molecular de 100 bp (KASVI); 1- Plasmídeo pPICZαA digerido.



A transformação foi confirmada pela amplificação do *primers AOX1*, como ficou evidenciado na amplificação. Podemos observar bandas na altura de cerca de 1000 pb (Amostras 1-5), resultado compatível com a literatura, e contrastante com o controle negativo utilizado (Amostra 6).

FIGURA 9 – PCR de colônia de bactérias *E.coli* TOP10F transformadas com o pPICZ α A/EDIIDENV-2 e -4.



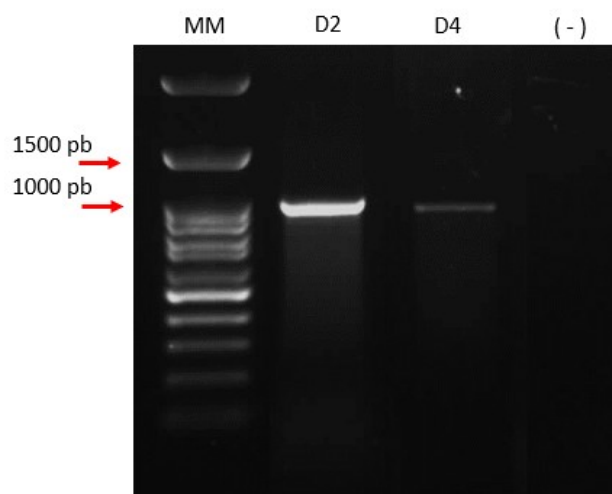
MM- Marcador de peso molecular de 100 bp (KASVI); 1-3 Fragmentos de DNA amplificados das bactérias *E. coli* transformadas com EDIIDENV-2 ;4-5 Fragmentos de DNA amplificados das bactérias *E. coli* transformadas com EDIIDENV-4; 6- pPICZ α A não clonado. Fonte: O autor

O DNA obtido das colônias confirmadas por PCR, digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*, identificado no gel de agarose 1% como duas bandas em alturas distintas: uma superior, de mais de 3600 pb referente ao plasmídeo pPICZ α A, e outra inferior, cerca de 1000 pb, coerente com o tamanho do gene do domínio III da proteína E de *DENV-2* e -4.

5.2 Confirmação da transformação de leveduras *Komagataella phaffii* KM71H com o plasmídeo pPICZ α A/EDIIDENV-2 e -4

A transformação das leveduras *K. phaffii* foi confirmada por meio de PCR, utilizando oligonucleotídeos para a região de *AOX1* do pPICZ α A/EDIIDENV-2 e -4. O produto da reação de PCR foi visualizado em gel de agarose 1%, e o controle negativo não apresentou (DNA levedura não transformada) (Figura 10). A amostra 1 é referente ao DNA genômico das leveduras transformadas com o plasmídeo pPICZ α A/EDIIDENV-2 e -4 e as bandas apresentadas estão em torno de 1000 pb.

FIGURA 10 – Produto da reação de PCR do DNA genômico das leveduras *K. phaffii* transformadas com o vetor de expressão pPICZαA/EDIIDENV-2 e -4.

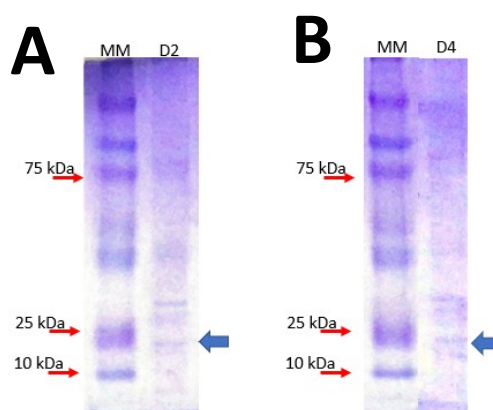


MM-Marcador de peso molecular de 100 bp (KASVI); 1-DNA de *K. phaffii* transformada com o plasmídeo EDIIDENV-2; 2-DNA de *K. phaffii* transformada com o plasmídeo EDIIDENV-4; 3- DNA de *K. phaffii* não transformada, utilizado como controle negativo. (O controle negativo não apresenta a banda, por não possuir o plasmídeo específico). Fonte: O autor.

5.3 Expressão do domínio III da proteína E de *DENV-2* e -4

Em seguida, ensaios preliminares de expressão foram realizados em cada clone, seguidos de purificação e confirmação por SDS-PAGE do DIII da proteína E de *DENV-2* e -4. Estes procedimentos mostraram bandas próximas de 17 kDa (Figura 11).

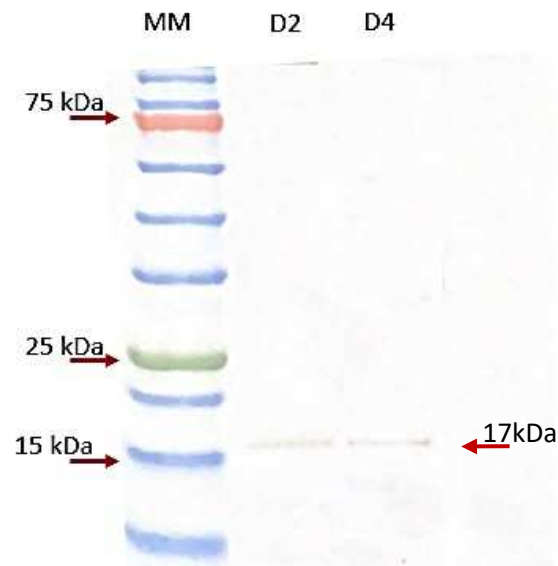
FIGURA 11 – Gel de SDS-PAGE 12% do domínio III da proteína E.



MM- Marcador de peso molecular (*SIGMA*); A- domínio III da proteína E de *DENV-2* (D2) e B- domínio III da proteína E de *DENV-4* (D4). Fonte: O autor.

Testes mais sensíveis como *Western Blotting* foram realizados para confirmação, tornando-se possível confirmar que essa banda de 17 kDa (Figura 12).

FIGURA 12 – *Western Blotting* para domínio III da proteína E de *DENV-2* e -4.



MM- Marcador de peso molecular de proteína (Sinapse); 1 domínio III da proteína E de DENV2(D2) e 2- domínio III da proteína E de *DENV-4* (D4). Banda de 17 kDa coerente com o peso molecular estimado do domínio III da proteína E. Fonte: O autor.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo a construção de um sistema de expressão heteróloga em *K. phaffii* para obtenção do domínio III da proteína estrutural E dos DENV-1 e DENV-4, em larga escala visando abrir caminhos para produção de testes diagnósticos menos onerosos.

Desta forma, os resultados obtidos demonstram que, na construção dos vetores de clonagem a partir do gene plasmideano, foram realizadas a partir das digestões enzimáticas do gene que codifica a região do domínio III da proteína E de DENV-2 e DENV-4. Este procedimento foi feito com as enzimas de restrição EcoRI e NotI, já que, durante a construção dos plasmídeos, foram inseridas nas extremidades da ORF sítios artificiais de restrição para as referidas endonucleases. Assim, foi possível verificar, por meio do produto de digestão, a existência do vetor PUC57 com, aproximadamente, 3000 pb e à banda do inserto de interesse na altura de 500 pb como as obtidas em outros trabalhos como Oliveira (2011), Paixão (2014) e Prates (2017) com a mesma plataforma. Assim, por digestão enzimática, foi possível confirmar a ocorrência nos sítios de restrição desejado.

Em seguida, foi feita a transformação entre o inserto EDIII de *DENV-2* e *-4* e o vetor pPICZ α A e inserido em *E.coli* TOP10F. Sendo a transformação confirmada pela amplificação do gene *AOX*, foi possível observar bandas na altura de cerca de 1000 pb, compatível com a literatura em Oliveira (2011), Paixão (2014) e Prates (2017) que utilizam a mesma plataforma.

O gene obtido das colônias confirmadas por PCR, digerido com as enzimas de restrição EcoRI e NotI, foi identificado em duas bandas em alturas distintas: uma superior, de mais de 3600 pb referente ao plasmídeo pPICZ α A, e outra inferior, cerca de 1000 pb, coerente com o tamanho do gene do domínio III da proteína E de *DENV-2* e *-4*. Diante desses resultados, a confirmação da ligação entre inserto e vetor foi realizada com sucesso, em que esses plasmídeos foram utilizados como sistema de transferência de genes para uma cepa mutante de *K. phaffii*, similares às produzidas em Oliveira (2011) e Paixão (2014).

A transformação das leveduras *K. phaffii* foi confirmada por meio de PCR, utilizando oligonucleotídeos para a região de *AOX1* do pPICZ α A/EDIIIIDENV-2 e *-4*. Esta transformação apresentou resultados divergentes do controle negativo, genoma de levedura não transformada, sendo o genômico das leveduras transformadas com o plasmídeo pPICZ α A/EDIIIIDENV-2 e *-4* e as bandas apresentadas em torno de 1000 pb. Os resultados obtidos demonstraram que a clonagem dos genes do DIII da proteína E de *DENV-2* e *-4* e possuíam o vetor pPICZ α A, sendo essa confirmação da clonagem feita através de PCR e demonstrando que os produtos da PCR apresentavam tamanho próximo a 1000 pb quando

comparados aos marcadores moleculares. Assim, por similaridades de tamanho, o resultado indica que as sequências obtidas correspondem aos genes dos DIII da proteína E de *DENV-2* e *-4*.

Em seguida, ensaios preliminares de expressão foram realizados em cada clone, seguidos de purificação e confirmação por SDS-PAGE do DIII da proteína E de *DENV-2* e *-4*. Estes procedimentos mostraram bandas próximas de 17 kDa, coerente com o tamanho estimado e sugeridos em Oliveira (2011) e Paixão (2014), confirmando que a expressão está ocorrendo de forma adequada.

Testes mais sensíveis, como Western Blotting, foram realizados para averiguação, tornando-se possível confirmar que essa banda de 17 kDa realmente corresponde ao domínio da proteína E. Assim, tanto por PCR como SDS-PAGE e *Western Blotting*, foi possível verificar a presença do plasmídeo pPICZ α A/EDIIIIDENV e a produção heteróloga do domínio III da proteína E, de ambos os clones. Tornou-se evidente, portanto, que o sistema eucariótico *K. phaffii* é um hospedeiro muito eficaz para a produção desta proteína, sendo expressas de forma solúvel no sobrenadante das culturas, além de se mostrarem antigênicas quando utilizadas nos testes de *Western Blotting*.

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem concluir que:

- Leveduras *K. phaffii* KM71H foram transformadas com o plasmídeo pPICZ α A/EDIIIIDENV-2 E -4 por eletroporação.
- O domínio III da proteína E dos *DENV*-2 e -4 foi produzido de forma eficaz pelas leveduras *K. phaffii* KM71H.
- O domínio III da proteína E obtida mostrou-se antigênica quando avaliada por *Western Blotting*, sendo úteis para o desenvolvimento de kits de diagnóstico para a dengue.

8. PERSPECTIVAS

A partir das linhagens de leveduras recombinantes obtidas neste trabalho, fazem-se necessários mais estudos na otimização da produção das proteínas heterólogas, sendo possível candidato como antígeno vacinal, pelo motivo de gerar anticorpos neutralizantes, sobretudo para se estabelecer uma escala industrial para fornecer proteína para o desenvolvimento de possíveis “kits diagnósticos” para o desenvolvimento de testes imunocromatográficos, que auxiliem o diagnóstico rápido da dengue.

9. REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.98, p.5301-5317, 2014.
- AVEYARD, J.; MEHRABI, M.; COSSINS, A.; BRAVEN, H.; WILSON, R. One step visual detection of PCR products with gold nanoparticles and a nucleic acid lateral flow (NALF) device. **Chemical Communications**. v.41, p.4251-4253, 2007.
- BÄCK, A. T.; LUNDKVIST A. Dengue viruses—an overview. **Infect Ecol Epidemiol** 3:1-21, 2013.
- BASTUS, N.G.; COMENGE, J.; PUNTES, V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening. **Langmuir: the ACS Journal of surfaces and colloids**. v.27, p.1088-1095, 2011.
- BASURKO, Célia et al. Estimating the risk of vertical transmission of dengue: a prospective study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1826, 2018.
- BISHT, Himani et al. Expressão e purificação da proteína do envelope do vírus da dengue tipo 2 como uma fusão com o antígeno de superfície da hepatite B em *Pichia pastoris*. **Expressão e purificação de proteínas**, v. 23, n. 1, p. 84-96, 2001.
- BRICKS, L.F. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatria**, v.26, n.4, pp.268-281. 2004.
- BRITISH BROADCASTING CORPORATION (BBC). **BBBC News** | Vacina da dengue: a corrida pela imunização que envolve pesquisadores brasileiros, japoneses e americanos. BBBC News Brasil 2019. Disponível em <<https://www.bbc.com/portuguese/brasil-46865264>> Acesso em: 3 Mar 2021.
- CABEZAS, C.; DE TRABAJO DE DENGUE, G. Dengue En El Perú: Aportes Para Su Diagnóstico Y Control. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 22, n. 3, p. 212–228, 2005.
- CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Aplicações de leveduras em biotecnologia: produção de proteínas e análise genética. **Opinião atual em biotecnologia**, v. 10, n. 5, pág. 422-427, 1999.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.
- CHO, I. H.; IRUDAYARAJ, J. Lateral-flow enzyme immunoconcentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.10, p.3313-3319, 2013.
- CHUNG, C. T.; NIEMELA, S. L.; MILLER, R. H. Preparação de *Escherichia coli* competente em uma etapa: transformação e armazenamento de células bacterianas na mesma solução. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 86, n. 7, pág. 2172-2175, 1989.
- COLAO, M. C. et al. Expressão heteróloga do gene *lcc1* de *trametes trogii* em *Pichia pastoris* e caracterização da enzima recombinante. **Microbial Cell Factories**, v. 5, n. 1, pág. 1-11, 2006.
- COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the levedura, *Pichia pastoris*. Purificação e propriedades do álcool oxidase. **Química agrícola e biológica**, v. 44, n. 10, pág. 2279-2289, 1980.
- CREGG, J. M. *et al.* *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 12, p. 3376-3385, 1985.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression. in *Pichia pastoris*. **Mol. Biotechnol.**, v.1, p.23-52, 2000.
- CREGG, J.M.; HIGGINS, D. R. Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Canadian journal of botany**, v. 73, n. S1, p. 891-897, 1995.

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.

DRYGIN, Y. F.; BLINTSOV, A. N.; GRIGORENKO, V. G.; ANDREEVA, I. P.; OSIPOV, A. P.; VARITZEV, Y. A.; USKOV, A. I.; KRAVCHENKO, D. V.; ATABEKOV, J. G. Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.1, p.179-189, 2012.

FIBRIANSAH, G.; IBARRA, K. D.; NG, T. S.; SMITH, S. A.; TAN, J. L.; LIM, X. N.; OOI, J. S.; KOSTYUCHENKO, V. A.; WANG, J.; DE SILVA, A. M.; HARRIS, E.; CROWE, J. E.; LOK, S. M. Dengue virus cryo-EM structure of an antibody that neutralizes dengue virus type 2 by locking E protein dimers. *Science* 349:88–91. 2015.

FIGUEIREDO, L.T.; CAVALCANTE, S.M.; SIMÕES, M.C. Dengue serologic survey of schoolchildren in Rio de Janeiro, Brazil, in 1986 and 1987. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, v. 24, n. 2, p. 217–25, 1990.

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. *Archives of Virology*. 2:223-233, 1991.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology & Biotechnology*, v. 54, n. 6, p. 741-750, 2000.

GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; LESELLIER, S.; HOUGHTON, R.; POLLOCK, J.; AAGAARD, C.; ANDERSEN, P.; HEWINSON, R. G.; CHAMBERS, M.; LYASHCHENKO, K. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v.46, p.197-203, 2003.

GRINNA, L. S.; TSCHOPP, J. F. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*, v. 5, n. 2, p. 107-115, 1989.

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

GUBLER, D. J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-Borne Disease Control in the 1990s: Top Down or Bottom Up. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 40, n. 6, p. 571–578, 1 jun. 1989.

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.

GUILLIERMOND, A. *Zygosaccharomyces Pastori*, Nouvelle Espèce de Levures à Copulation Hétérogamique. **France: Bulletin de la Société Mycologique de France**, 1920.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. *The Lancet*, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015.

GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 3:621-627, 1996.

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. *Clinical Microbiology Reviews*. 3(4):376-396, 1990.

IDRIS, F.; MUHARRAM, S. H.; DIAH, S. Glycosylation of dengue virus glycoproteins and their interactions with carbohydrate receptors: possible targets for antiviral therapy. *Archives of Virology*, v. 161, n. 7, p. 1751–1760, 11 jul. 2016.

ISTÚRIZ, R. E.; GUBLER, D. J.; BREA DEL CASTILLO, J. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. *Infectious disease clinics of North America*, v. 14, n. 1, p. 121–40, ix, mar. 2000.

JAPOLLA, G.; et al. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral: uma ferramenta rápida de diagnóstico. 2015.

- JIN, S.; CHANG, Z. Y.; MING, X.; MIN, C. L.; WEI, H.; SHENG, L. Y.; HONG, G. X. Fast dipstick dye immunoassay for detection of immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies of human toxoplasmosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.12, p.198-201, 2005.
- KARAKUS, C.; SALIH, B. A. Comparison of the lateral flow immunoassays (LFIA) for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Immunological Methods**. v.396, p. 8-14, 2013.
- KAVOSI, B.; HALLAJ, R.; TEYMOURIAN, H.; SALIMI, A. Au nanoparticles/PAMAM dendrimer functionalized wired ethyleneamine-viologen as highly efficient interface for ultra-sensitive alpha-fetoprotein electrochemical immunosensor. **Biosensors & bioelectronics**. v.15, p.389-396, 2014.
- KING, A.; INNIS, B.L.; CAUDLE, L. B-cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. **Faseb Journal**. 5, A 9998, 1991.
- KIRKPATRICK, B. D. et al. The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 330, p. 330ra36-330ra36, 2016.
- KLEIN, D. E.; CHOI, J. L.; HARRISON, S. C. Estrutura de um intermediário de fusão de estágio final da proteína do envelope do vírus da dengue. **J Virol** 87 (4): 2287–2293. 2013.
- KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C. T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUSS, E. G.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell** 108:717–725. 2002.
- KURTZMAN, C. P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55, p. 973-976, 2009.
- LAITINEN, M. P.; VUENTO, M. Affinity immunosensor for milk progesterone: identification of critical parameters. **Biosensors & bioelectronics**. v.11, p.1207- 1214, 1996.
- LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4738–47, jun. 1999.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23–61, 2003.
- LIU, C.; LIU, C.; JIA, Q.; YANG, C.; QIAO, R.; JING, L.; WANG, L.; XU, C.; GAO, M. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe₃O₄ nanoparticle aggregates as color reagents. **Analytical chemistry**. v.17, p.6778-6784, 2011.
- 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. **Journal of Virology**. 156: 127-132, 1987.
- MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. DME. Patogênese do vírus da dengue: uma visão integrada. **Revisões de microbiologia clínica**, v. 22, n. 4, p. 564-581, 2009.
- MARTINEZ, D. R.; METZ, S. W.; BARIC, R. S. Dengue Vaccines: The Promise and Pitfalls of Antibody-Mediated Protection, **Cell Host & Microbe**, Volume 29, Issue 1, Pages 13-22, ISSN 1931-3128. 2021.
- MILLER, J. L.; HILL, M. L.; BRUN, J.; Pountain, A., Sayce, A.C. and Zitzmann, N. Iminosugars counteract the downregulation of the interferon γ receptor by dengue virus. **Antiviral research**, 170, p.104551. 2019.
- MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Estrutura da proteína do envelope do vírus da dengue após a fusão da membrana. **Nature**, 427 (6972), p. 313-319, 2004.
- MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature** 427:313–319. 2004.

- NOR, N. M.; RAZAK, K. A.; TAN, S. C.; NOORDIN, R. Properties of surface functionalized iron oxide nanoparticles (ferrofluid) conjugated antibody for lateral flow immunoassay application. **Journal of Alloys and Compounds**. v.538, p.100–106. 2012.
- O'FARRELL, B. **Evolution in Lateral Flow Immunoassay Systems**. In; Wong RC, Tse HY, editors. Lateral Flow Immunoassay. Springer, New York: Springer.p.1-34, 2009.
- OLIVEIRA, A. S. de. Expressão heteróloga do domínio III da proteína de envelope (E) do vírus dengue-1 e 2 em *Pichia pastoris*. 48f. **Dissertação** (Mestrado em Análises quantitativas e moleculares do Genoma; Biologia das células e dos tecidos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **OMS** (2022). *Distribuição e intensidade da presença do vírus da dengue no mundo*. Disponível em: <https://www.healthmap.org/dengue/en/>. Acesso em 03 mar 2021.
- PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and chikungunya: emerging arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, 17(6), p. 671. 2016.
- PAIXÃO, V. F. da. Construção e expressão heteróloga de domínio III da proteína de envelope (E) dos vírus dengue-1e-3 em *Pichia pastoris*. 60f. **Dissertação** (Mestrado em Análises quantitativas e moleculares do genoma; Biologia das células e dos tecidos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; SHIFRINE, M. The taxonomy of yeasts isolated from drosophila in the yosemite region of California. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 22, 145-161, 1956.
- POSTHUMA-TRUMPIE, G. A.; KORF, J.; VAN AMERONGEN, A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.393, p.569-82, 2009.
- PRATES, J. W. O. Expressão das proteínas não-estrutural 1 (NS1) dos vírus Dengue-1, Dengue-3 e Dengue-4 em *Pichia pastoris*. 34f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.
- RATHORE, A. S.; SARKER, A.; GUPTA, R. D. Production and immunogenicity of Fubc subunit protein redesigned from DENV envelope protein. **Appl Microbiol Biotechnol** 104, 4333–4344. 2020.
- RATNER, M. Expressão de proteínas em leveduras. **Bio/Technology**, v. 7, n. 11, pág. 1129-1133, 1989.
- 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.
- ROCHA, L. B. Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). 2012. Tese. **Universidade de São Paulo, Instituto Butantan**, São Paulo.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences*, 67(16), pp.2773-2786. 2010.
- RODRIGUES, P. R. C.; et al. Expressão e caracterização da glicoproteína D do herpesvírus equídeo 1 em *Pichia pastoris*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 703-710, 2020.
- 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.
- ROMANO, C. M.; et al. Diversidade viral inter e intra-hospedeiro em um grande surto sazonal de DENV2. **PLoS One**, v. 8, n. 8, pág. e70318, 2013.
- SAJID, M.; KAWDE, A. N.; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: a literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**. 2014.

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

SCHERWITZL, I.; MONGKOLSAPAJA, J.; SREATON, G. Recent advances in human flavivirus vaccines. **Current Opinion in Virology**, v. 23, p. 95–101, 2017.

SHYU, R. H.; TANG, S. S.; CHIAO, D. J.; HUNG, Y. W. Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B. **Food Chemistry**, v.118, p.462-466, 2010.

SIMMONDS, P. et al. Ictv Report C. 2017. **ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae**. **J Gen Virol**, v. 98, p. 2-3.

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.

SUGRUE, Richard Joseph et al. A expressão das proteínas estruturais do vírus da dengue em *Pichia pastoris* leva à geração de partículas semelhantes a vírus. **Journal of general virology**, v. 78, n. 8, p. 1861-1866, 1997.

VALDÉS, I. et al. Expressão em *Pichia pastoris* e avaliação imunológica de uma proteína truncada do envelope da Dengue. **Biotecnologia molecular**, v. 35, n. 1, p. 23-30, 2007.

VIJAYAN, T.; CHILLER, T.; KLAUSNER, J. D. Sensitivity and specificity of a new cryptococcal antigen lateral flow assay in serum and cerebrospinal fluid. **MLO: Medical Laboratory Observer**, v.3, p.16-20, 2013.

VORDAM, V.; 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, p. 313-334, 1997.

WANG, Y.; WANG, L.; ZHANG, J.; WANG, G.; CHEN, W.; CHEN, L.; ZHANG, X. Preparation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of *Paragonimiasis skrjabini*. **PloS One**, v.3, p. 2034-2039, 2014.

WAYNE, D. C.; JOHN, T. R. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. **Journal of Virology**, p. 7769-7773, 2001.

WEI, D. et al. A ativação de Stat3 regula a expressão do fator de crescimento endotelial vascular e da angiogênese e metástase do câncer pancreático humano. **Oncogene**, v. 22, n. 3, p. 319-329, 2003.

WIDIYANTI, D.; KOIZUMI, N.; FUKUI, T.; MUSLICH, L. T.; SEGAWA, T.; VILLANUEVA, S. Y.; SAITO, M.; MASUZAWA, T.; GLORIANI, N. G.; YOSHIDA, S. Development of immunochromatography-based methods for detection of leptospiral lipopolysaccharide antigen in urine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.20, p. 683-690, 2013.

WILLEN, L.; MERTENS, P.; VOLF, P. Evaluation of the rSP03B sero-strip, a newly proposed rapid test for canine exposure to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*. **PLoS Negl Trop Dis** 12(8): e0006607, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO | Dengue and severe dengue**. World Health Organization, 2022. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 2 set. 2022.

XIE, Q. Y.; WU, Y. H.; XIONG, Q. R.; XU, H.Y.; XIONG, Y. H.; LIU, K.; JIN, Y.; LAI, W.H. Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays. **Biosensors & Bioelectronics**, v.54, p. 262-265, 2014.

XISTO, M. F.; PRATES, J. W. O.; DIAS, I. M.; DIAS, R. S.; DA SILVA, C. C.; DE PAULA, S. O. NS1 recombinant proteins are efficiently produced in *pichia pastoris* and have great potential for use in diagnostic kits for dengue virus infections. **Diagnostics**, 10(6), 379, 2020.

YAMADA, Y.; MATSUDA, M.; MAEDA, K.; MIKATA, K. The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae). **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 59, p. 439-444, 1995.

YONEKITA, T.; OHTSUKI, R.; HOJO, E.; MORISHITA, N.; MATSUMOTO, T.; AIZAWA, T.; MORIMATSU, F. Development of a novel multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**. v.3, p.251-256, 2013.