

MICHELLE DIAS DE OLIVEIRA TEIXEIRA

**EXPRESSÃO DOS GENES SINTÉTICOS prM E E DO VÍRUS DENGUE-3 EM  
*PICHIA PASTORIS*: AVALIAÇÃO DO USO EM DIAGNÓSTICO DA DENGUE  
E ANÁLISE DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DAS PROTEÍNAS**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

T266e  
2014  
Teixeira, Michelle Dias de Oliveira, 1986-  
Expressão dos genes sintéticos prM e E do vírus dengue-3  
em *Pichia pastoris* : avaliação do uso em diagnóstico da dengue  
e análise do potencial imunogênico das proteínas / Michelle Dias  
de Oliveira Teixeira. – Viçosa, MG, 2014.  
xiv, 96f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.84-96.

1. Dengue - Vacina. 2. Diagnóstico. 3. *Pichia pastoris*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 614.571

MICHELLE DIAS DE OLIVEIRA TEIXEIRA

**EXPRESSÃO DOS GENES SINTÉTICOS prM E E DO VÍRUS *DENGUE-3* EM  
*PICHIA PASTORIS*: AVALIAÇÃO DO USO EM DIAGNÓSTICO DA DENGUE  
E ANÁLISE DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DAS PROTEÍNAS**

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

APROVADA: 9 de setembro de 2014.

---

Clarissa Damaso

---

Monique Renon Eller

---

Rodrigo Siqueira Batista

---

Andreia Patrícia Gomes

---

Sérgio Oliveira de Paula  
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus filhos  
Victor e Gabriele, ao meu esposo Júnio  
e aos meus pais Tarcísio e Cida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter sido sempre presente em minha vida e por ser o meu refúgio em todos os momentos. A ELE, toda a minha gratidão.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de aprendizado.

À CAPES, ao Cnpq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Sérgio Oliveira de Paula, exemplo de competência, pela orientação, amizade e pela compreensão nos momentos difíceis.

Aos professores da banca examinadora, pelas correções e sugestões dadas, contribuindo para o meu crescimento profissional e para enriquecimento deste trabalho.

Aos meus filhos Gabriele e Victor, minha vida. Obrigada por vocês existirem e por compreenderem, mesmo tão pequenos, a falta da mamãe em muitos momentos, principalmente nos fins de semana. A vocês todo o meu amor e carinho!

Ao meu marido Júnio, por toda a compreensão nas minhas ausências devido aos experimentos, pelo companheirismo e por me mostrar sempre que o amor se constrói a cada dia, independente das dificuldades.

Aos meus pais, Tarcísio e Cida, por nunca terem me deixado desanimar. Por me ensinarem que por maior que seja a dificuldade nada é tão grande que não possamos vencer.

À Juliana por me animar nas vezes em que algo dava errado e por ser uma estagiária tão dedicada.

Ao Roberto, pelo auxílio nas análises de microscopia.

Aos demais amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular. Agradeço a todos pela ajuda nos experimentos e pelos momentos agradáveis que tornaram esta caminhada mais suave.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, por ter permitido a realização de parte dos experimentos.

Ao professor Leandro Licursi pelo auxílio durante os experimentos de citometria de fluxo.

À professora Silvia Cardoso pela ajuda nos experimentos.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta conquista.

## BIOGRAFIA

MICHELLE DIAS DE OLIVEIRA TEIXEIRA nasceu em 12 de maio de 1986 em Viçosa, Minas Gerais. É filha de José Tarcísio de Oliveira e Aparecida Amélia Dias de Oliveira. Concluiu o ensino médio em 2003, no colégio de aplicação COLUNI da Universidade Federal de Viçosa.

Em 2005, ingressou no curso de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa e formou-se bacharel em bioquímica em julho de 2010. Foi bolsista de iniciação científica, trabalhando com a construção e avaliação de uma vacina de DNA contra a dengue. Em 2011 ingressou como aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, na mesma instituição.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Características Gerais da Dengue.....	2
1.2. Os vírus dengue.....	6
1.3. Prevenção e Diagnóstico .....	11
1.4. Expressão de proteínas em leveduras.....	16
1.5 Virus - like Particles (VLPs) .....	17
2. JUSTIFICATIVA .....	20
3. OBJETIVOS .....	22
3.1 Objetivo Geral:.....	23
3.2. Objetivos específicos: .....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
4.1. Células e Plasmídeos.....	25
4.2 Estoques Virais .....	26
4.3 Titulação Viral .....	26
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	27
4.5 Preparação de Bactérias Competentes .....	28
4.6 Inserção dos Genes Otimizados em Vetor de Clonagem .....	29
4.7 Análise do DNA Plasmidial Extraído das Colônias Transformadas.....	29
4.8 Ensaios de Restrição Enzimática .....	30
4.9 Clonagem dos Genes Otimizados das Proteínas prM e E no Vetor de Expressão pPICZ $\alpha$ A .....	30
4.10 Transformação de Leveduras <i>Pichia pastoris</i> KM71H .....	31
4.11 Purificação das proteínas prM e E do vírus dengue-3 em coluna de níquel .....	32
4.12 Análise das frações obtidas na cromatografia de afinidade .....	33
4.13 Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	34
4.14 Purificação das proteínas prM e E recombinantes através de precipitação com sulfato de amônio .....	35
4.15 ELISA indireto .....	35
4.16 Avaliação do potencial imunogênico das proteínas prM e E recombinantes.....	37

4.16.1	Imunização dos animais .....	37
4.16.2	Processamento do baço dos animais imunizados.....	37
4.16.3	Linfoproliferação.....	38
4.16.4	Imunofenotipagem das células do baço dos animais imunizados.....	38
4.16.5	Análise da expressão de citocinas por Real Time PCR .....	39
4.16.6	Imunofluorescência indireta.....	40
4.16.7	Reação de Neutralização em placas (PRNT) .....	41
4.16.8	Determinação da Dose Letal 50 (DL50) .....	41
4.16.9	Ensaio de Proteção Pós-Desafio.....	41
5.	RESULTADOS .....	43
5.1	Titulação Viral .....	44
5.2	Clonagem das sequências dos genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 no vetor de clonagem pTZ57R/T .....	44
5.3	Clonagem dos genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 no vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A .....	46
5.4	Transformação de leveduras <i>Pichia pastoris</i> KM71H com os genes de interesse.....	46
5.5	Purificação e caracterização das proteínas prM e E do vírus dengue-3 produzidas em <i>P. pastoris</i> em coluna de níquel .....	49
5.6	Ultracentrifugação do sobrenadante da cultura de leveduras em gradiente de sacarose .....	51
5.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	52
5.8	Purificação das proteínas recombinantes a partir de precipitação com sulfato de amônio.....	53
5.9	ELISA indireto .....	55
5.10	Análise do potencial imunológico das proteínas prM e E recombinantes .....	57
5.10.1	Imunofenotipagem das células dos baços dos animais imunizados.....	57
5.10.2	Linfoproliferação.....	64
5.10.3	Análise da expressão de citocinas por Real Time PCR .....	64
5.10.4	Imunofluorescência indireta.....	66
5.10.5	Análise da produção de anticorpos neutralizantes .....	67
5.10.6	Determinação da Dose Letal50 e Proteção Pós-Desafio.....	68
6.	DISCUSSÃO .....	69
7.	CONCLUSÕES .....	79
8.	PERSPECTIVAS .....	81
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Esquema da organização do genoma dos vírus da dengue.....	7
Figura 2: Representação gráfica dos níveis da proteína NS1 e dos anticorpos IgM, IgG e IgA em relação ao tempo em infecções primárias e secundárias pelos vírus dengue.....	15
Figura 3: Mapa do vetor de clonagem pTZ57R/T.....	25
Figura 4: Mapa do vetor de expressão pPICZαA.....	26
Figura 5: Sequência dos genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 otimizadas para expressão em leveduras .....	44
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação dos genes sintéticos.....	45
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose do produto da digestão com as enzimas EcoRI e NotI do plasmídeo pTZ57R/T contendo os genes prM e E sintéticos.....	45
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose dos produtos das digestões com as enzimas EcoRI e NotI do plasmídeo pPICZαA contendo os genes sintéticos.....	46
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose da digestão com SacI.....	47
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de colônia das leveduras <i>P. pastoris</i> KM71H para a confirmação da transformação com os genes de interesse.....	48
Figura 11: Eletroforese em gel de poliácridamida do sobrenadante da cultura de leveduras após indução com metanol.....	49
Figura 13: Western blot da fração ligante utilizando anticorpo anti- His Tag .....	51
Figura 14: Eletroforese em gel de poliácridamida das frações obtidas após ultracentrifugação do sobrenadante da cultura das leveduras transformadas em gradiente de sacarose.....	52
Figura 15: Micrografia do sobrenadante da cultura de <i>P. pastoris</i> transformadas com os genes prM e E do vírus dengue-3.....	53
Figura 16: Eletroforese em gel de poliácridamida das frações provenientes das precipitações do sobrenadante das leveduras transformadas após indução com metanol.....	54

Figura 18: ELISA indireto para a detecção de anticorpos IgM anti-dengue em soros de pacientes utilizando a fração de 20% oriunda da precipitação com sulfato de amônio como antígeno.....	56
Figura 19: ELISA indireto para a detecção de anticorpos IgM e IgG anti-dengue em soros de pacientes utilizando-se a fração proveniente da precipitação com 80% de sulfato de amônio como antígeno.....	56
Figura 20: Análise do número de células B nos baços dos animais imunizados .....	57
Figura 21: Análise da população de células CD4 presentes nos baços dos animais imunizados. ....	60
Figura 22: Análise da população de células CD8 presentes nos baços dos animais imunizados. ....	63
Figura 23: Linfoproliferação dos esplenócitos extraídos dos animais imunizados com PBS, proteínas recombinantes e vírus dengue-3.. ....	64
Figura 24: Expressão dos RNAs mensageiros das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ após estímulo dos esplenócitos com o vírus dengue-3.....	66
Figura 25: Imunofluorescência indireta dos vírus dengue-3 utilizando-se soros de camundongos imunizados utilizando FITC.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos “primers” utilizados para a amplificação dos genes sintéticos das proteínas prM e E do vírus dengue-3. ....	28
Tabela 2: Sequência dos “primers” do domínio III da proteína E do vírus dengue-3 otimizado e do AOX1, utilizados para a verificação da correta transformação das leveduras com o plasmídeo recombinante. ....	32
Tabela 3: Sequência dos “primers” utilizados para amplificação dos genes de $\beta$ -actina, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10. ....	38
Tabela 4: Título de anticorpos neutralizantes induzidos após imunização com PBS, vírus dengue-3 e proteínas prM e E recombinantes. ....	68

## RESUMO

TEIXEIRA, Michelle Dias de Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2014. **Expressão dos genes sintéticos prM e E do vírus dengue-3 em *Pichia pastoris*: avaliação do uso em diagnóstico da dengue e análise do potencial imunogênico das proteínas.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Co-orientadora: Silvia Almeida Cardoso.

A dengue é a principal arbovirose que acomete humanos da atualidade. Com o número de casos cada vez maior é essencial a produção em larga escala de antígenos para o desenvolvimento de kits de diagnóstico rápidos para a detecção de pacientes infectados pelos vírus e a consequente intervenção médica adequada para os mesmos. Além disso, não há vacina eficaz disponível contra esta moléstia que acomete grande parte da população mundial. Assim, neste trabalho nós expressamos as proteínas prM e E do vírus dengue-3 em leveduras *Pichia pastoris* KM71H. As proteínas foram produzidas de forma solúvel no sobrenadante da cultura sob a forma de “vírus-like particles” (VLPs). O sobrenadante da cultura de leveduras foi submetido à purificação de proteínas através de cromatografia de afinidade usando uma coluna de níquel, porém sem êxito. Assim, o mesmo foi submetido a precipitações com concentrações de saturação crescentes de sulfato de amônio. Após confirmação por Western Blot, a fração de 20% de sulfato de amônio foi utilizada como antígeno em teste de ELISA indireto utilizando soros de pacientes, fornecendo sensibilidade de 73,91% e especificidade de 82,61%. Já a fração proveniente da precipitação com 80% mostrou-se mais satisfatória, fornecendo um teste com 82,61% de sensibilidade e 89,25% de especificidade para a detecção de anticorpos IgM específicos. Ainda, a fração e 80% foi utilizada para a pesquisa de anticorpos IgG específicos contra o vírus, fornecendo 76,09% de sensibilidade e 84,78% de especificidade. As frações de 20% e 80% foram avaliadas também quanto à sua capacidade de gerar respostas imunes contra o vírus dengue-3 em camundongos. Foi observada uma indução de resposta imune Th2, verificado pelo aumento da produção de IL-4 e IL-10 quando as células dos baços dos animais previamente imunizados foram estimuladas com o vírus dengue-3. Também foi induzida a produção anticorpos específicos nestes animais, mostrado através de imunofluorescência

indireta utilizando-se os soros dos camundongos imunizados. Além disso, foi determinada a capacidade neutralizante de tais anticorpos, com um título de 512 de anticorpos neutralizantes. Também foi detectado nos animais imunizados com as proteínas recombinantes um aumento na população de células TCD4 ativadas e TCD4 de memória central. Dessa forma, a metodologia aqui proposta mostrou-se promissora para a obtenção de antígenos dos vírus dengue na busca por um candidato vacinal eficaz e criação de testes diagnósticos rápidos e baratos, o que é de grande valia uma vez que grande parte das áreas atingidas pela dengue são economicamente negligenciadas.

## ABSTRACT

TEIXEIRA, Michelle Dias de Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, september, 2014. **Expression of synthetic genes prM and E of dengue-3 virus in *Pichia pastoris*: evaluation of use in dengue diagnosis and analysis of the immunogenic potential of the proteins.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-adviser: Sílvia Almeida Cardoso.

Dengue is a major arbovirus affecting humans today. With the growing number of cases, it is essential to have large-scale production of antigens for the development of diagnostic kits for the rapid detection of patients infected by the virus and consequent proper medical intervention for them. Furthermore, there is no effective vaccine available against this disease that affects much of the world's population. In this work we express the prM and E proteins of dengue-3 virus in yeast *Pichia pastoris* KM71H. The proteins were produced in soluble form in the supernatant of the culture in the form of "virus-like particles" (VLPs). The supernatant of yeast culture was subjected to protein purification by affinity chromatography using a nickel column, but without success. Thus, the supernatant was subjected to precipitation with increasing concentrations of ammonium sulfate. After confirmation by Western Blot, the fraction of 20% of ammonium sulfate was used as antigen in an indirect ELISA test, using patients serum providing a sensitivity of 73.91% and specificity of 82.61%. The fraction from the precipitation with 80% proved more satisfactory, providing a test with 82.61% of sensitivity and 89.25% specificity for the detection of specific IgM antibodies. Further, the fraction of 80% was used for the detection of specific IgG antibodies against the virus, providing 76.09% of sensitivity and 84.78% of specificity. The fractions of 20% and 80% were also evaluated for their ability to generate immune responses against dengue-3 virus in mice. An induction of immune response Th2 was observed, checked by increased production of IL-4 and IL-10 when the cells from the spleens of immunized animals were stimulated with dengue-3 virus. Also there was an induction of specific antibodies in these animals, as shown by indirect immunofluorescence using the sera of mice immunized. Moreover, the neutralizing ability of such antibodies was determined with a titer of 512. Also an increase was detected in animals immunized with the recombinant protein in the population of activated TCD4 cells and central memory TCD4 cells. Thus, the methodology proposed here

showed promise for obtaining antigens of dengue viruses in search for an effective vaccine candidate and creating quick and inexpensive diagnostic tests, which is of great value since large portions of the areas affected by this disease are economically neglected.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Características Gerais da Dengue

A dengue é a principal arbovirose que acomete humanos na atualidade, sendo que 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco. Ocorrem anualmente de 50 a 100 milhões de infecções e dentre estas 500.000 evoluem para as formas mais graves da doença, como a síndrome do choque da dengue (SSD) e a febre hemorrágica da dengue (FHD) com cerca de 25.000 mortes. Em 2013 2,3 milhões de casos foram registrados pela Organização Mundial de Saúde somente no continente americano (Guzman et al., 2010; WHO, 2014).

O agente etiológico da doença é o vírus dengue, o qual compreende quatro sorotipos, dengue-1, dengue-2, dengue-3 e dengue-4, que são igualmente capazes de causar todas as manifestações clínicas da doença (Gubler, 2002). Há ainda a descrição de um quinto sorotipo, o dengue-5, que é geneticamente e antigenicamente diferente dos demais sorotipos. Este sorotipo foi encontrado em amostras de soros de pacientes durante uma epidemia na Malásia em 2007. No entanto, acredita-se que não haja um ciclo de transmissão permanente em humanos, somente em primatas não humanos (Normile, 2013).

A dengue é transmitida para humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*, mas os vírus também podem ser transmitidos por mosquitos *Aedes albopictus*. O controle da doença tem se concentrado no combate ao vetor, porém a implementação de tal medida não é muito eficaz, uma vez que o número de infecções cresce a cada ano. Este aumento da incidência da doença deve-se, pelo menos em parte, à expansão geográfica do vetor *Aedes aegypti* além da diminuição dos esforços para o controle do mosquito (Gubler, 1998).

O combate a dengue representa um enorme desafio político e sócio-econômico que requer uma resposta integrada em nível regional, nacional e mundial, pois além da necessidade do desenvolvimento de uma vacina eficiente é preciso também mudanças no campo político. Um exemplo disso foi o reaparecimento da doença em países como a Guatemala e o Brasil, após 1968. Depois do surto de dengue nos Estados Unidos em 1945, a Organização de Saúde Panamericana decretou uma resolução visando erradicar o *A.*

*aegypti* em 1947. No período entre 1952 e 1965 dezenove países da América Latina foram certificados como livres do mosquito (Tapia-Conyer *et al*, 2009).

Três fatores podem ser apontados como responsáveis pelo reaparecimento da doença nessa região. Nem todos os países possuíam uma política de erradicação do mosquito transmissor, e entre aqueles que a tinham, o interesse em manter tal erradicação foi baixo. Além do mais, uma vez o início da reinfestação, a reação para combater a nova ameaça foi lenta. De um ponto de vista econômico, os gastos com equipamentos, suprimentos e salários para aqueles envolvidos no combate ao mosquito foram um incentivo ao abandono dos programas de erradicação. Finalmente, o êxodo rural acompanhado de precárias condições sanitárias contribuiu fortemente para a propagação do vetor. Como consequência, a dengue é mais uma vez um grave problema de saúde pública na América Latina e no Caribe (Tapia-Conyer *et al*, 2009).

Os mosquitos são infectados quando se alimentam do sangue de uma pessoa infectada com viremia, que dura de 7 a 10 dias. Os mosquitos permanecem infectados por toda a vida e podem transmitir o vírus através da via transovariana para a progênie, o que aumenta a infecção em áreas endêmicas (Murphy and Whitehead, 2011).

Os vírus dengue são agentes etiológicos conhecidos há cerca de cem anos. Acredita-se que tais vírus tenham evoluído de primatas não-humanos que foram mantidos na população humana, quando a densidade populacional da mesma tornou-se suficiente para sustentar o ciclo de transmissão mosquito-humano-mosquito (Vasilakis *et al.*, 2007). Os vírus dengue ainda podem ser encontrados em florestas da Ásia e Oeste da África em um ciclo silvestre de transmissão. A infecção de humanos a partir desses reservatórios silvestres tem sido documentada (Vasilakis *et al.*, 2008). Apesar disso, a contribuição deste ciclo para a transmissão em epidemias urbanas é mínima (Whitehead *et al*, 2007).

A dengue é endêmica em mais de 100 países situados na África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (WHO, 2014). A rápida e intensa propagação da doença em áreas tropicais e subtropicais também pode ser devido à introdução de múltiplos sorotipos do vírus e ao aumento da urbanização e movimento de pessoas vindas das áreas endêmicas (Kyle and Harris, 2008). Isto leva à classificação da dengue como

uma doença infecciosa emergente, o que intensificou os esforços para o desenvolvimento da vacina (Murphy and Whitehead, 2011).

A infecção pelos vírus dengue pode resultar em diferentes quadros ou apresentações clínicas, que vão de infecções assintomáticas até a febre hemorrágica da dengue (FDH) ou a síndrome do choque da dengue (SCD) (Halstead, 1988). Essas variações da doença são diferenciadas de acordo com o grau de permeabilidade vascular e manifestações hemorrágicas. A maioria das infecções sintomáticas se apresenta como a febre da dengue clássica, com um período de incubação que pode abranger de 3 a 14 dias, mas geralmente é de 4 a 7 dias. Esta variante da doença é caracterizada por febre acompanhada de dores de cabeça, dor retro-ocular, mialgia e artralgia generalizadas, anorexia, dor abdominal e náuseas. Além disso, exames laboratoriais normalmente detectam leucopenia, trombocitopenia e elevação dos níveis de amino transferases no soro dos pacientes infectados (Kalayanarooj et al., 1997). O rash cutâneo é comum, e normalmente há uma completa recuperação do doente (Whitehead *et al*, 2007).

Já as formas mais graves da doença, como a febre da dengue hemorrágica e a síndrome do choque da dengue são caracterizadas por febre, aumentada permeabilidade vascular sem danos morfológicos ao endotélio, leucopenia, trombocitopenia, elevados níveis de amino transferases e hemoconcentração. A viremia é cerca de 100 vezes maior do que na febre da dengue clássica. Estas formas são encontradas principalmente em áreas endêmicas nas quais mais de um sorotipo está circulando. O extensivo vazamento do plasma em cavidades serosas como a pleura, a cavidade peritoneal e o pericárdio pode resultar em choque hipovolêmico. O curso do choque é curto, mas há risco de vida, com morte ou recuperação em 24 horas. Insuficiência hepática aguda e manifestações neurológicas também são relatados em indivíduos com dengue (Chaturvedi *et ai*, 2005; Whitehead *et al*, 2007; Rothman, 2011).

A Organização Mundial de Saúde classifica a febre hemorrágica da dengue em quatro graus (I a IV). Os graus I e II representam casos relativamente brandos sem choque, enquanto os graus III e IV representam casos mais graves que são acompanhados por choque (Martina et al., 2009).

Durante o curso da doença, a resposta imune adaptativa pode ter um papel duplo. Esta resposta é o principal fator contribuinte para debelar a infecção e proteger contra infecções futuras, bem como pode ser crucial para o agravamento da doença observado em pacientes com febre hemorrágica e síndrome do choque da dengue (Whitehead et al., 2007).

Este agravamento da doença é geralmente observado durante uma infecção secundária por um sorotipo diferente da primeira infecção. Acredita-se que os anticorpos heterotípicos não neutralizantes pré-existentes aumentam a infecção de células que expressam o receptor de Fc. Isto resulta em um título viral aumentado, o que resultaria em uma ativação imune exacerbada, que mediaría os eventos patológicos observados durante a FDH e SCD. Tal fenômeno é denominado Agravamento Dependente de Anticorpo (ADE) (Halstead, 1977; Rothman, 2004).

Há ainda uma massiva secreção de citocinas, o que é um dos principais fatores contribuintes para a imunopatologia das formas mais graves da doença. Os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias são elevados em pacientes com febre da dengue hemorrágica antes do extravasamento de plasma e o grau dessa elevação está associado com a gravidade da doença. Assim ocorre uma massiva estimulação do sistema imune, o que culmina em uma “tempestade de citocinas”. (Rothman, 2011). Acredita-se que esta tempestade de citocinas e mediadores imunes seja induzida pela ativação de um alto número de células T de baixa avidéz com reatividade cruzada, um processo referido como “original antigenic sin” (Rodenhuis-zybert et al., 2010). A hipótese descrita acima não exclui a hipótese de ADE, com ambas provavelmente contribuindo para a progressão de formas mais graves da dengue observada geralmente em infecções secundárias.

Outro componente que seria responsável pelos problemas causadores das variantes mais agravadas da dengue seria o sistema do complemento, pois muitas das citocinas massivamente secretadas durante o agravamento imune são reguladas pelas proteínas deste sistema (Nielsen, 2009). Assim, o efeito sinérgico desses fatores resultaria nas complicações observadas durante o desenvolvimento das formas mais graves.

## 1.2. Os vírus dengue

Os vírus dengue pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, o qual inclui outros vírus de importância médica, como vírus da febre amarela, vírus West Nile, vírus da encefalite japonesa e o vírus da encefalite tick-borne (Burke and Monath, 2001).

São vírus envelopados cujo genoma consiste de um RNA fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 11 kb, composto por uma única janela aberta de leitura. A poliproteína gerada é processada por proteases virais e do hospedeiro em três proteínas estruturais, denominadas C, prM e E que compõem o virion e sete proteínas não estruturais, que são NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, envolvidas na replicação do RNA viral, montagem e modulação da resposta imune da célula hospedeira (Lindenbach and Rice 2003; Fischl and Bartenschlager, 2011). O genoma contém regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3' que possuem papéis centrais na regulação da tradução e da replicação do genoma do vírus (Clyde and Harris, 2006). A região 5' UTR possui cerca de 100 nucleotídeos e possui uma estrutura do tipo Cap, a qual é importante para a iniciação do processo de tradução, enquanto a região 3' UTR é mais longa, com aproximadamente 450 nucleotídeos, contém várias estruturas secundárias conservadas e não possui poliadenilação (Murphy and Whitehead, 2011). A organização do genoma e da poliproteína são mostradas na figura 1.

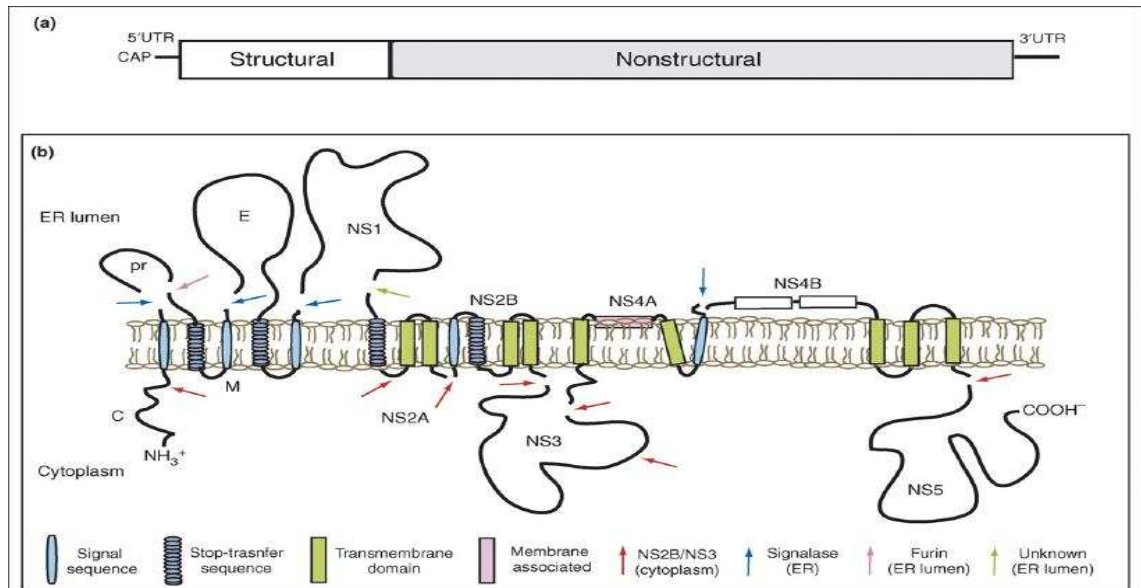


Figura 1: (a) Esquema da organização do genoma dos vírus da dengue mostrando as regiões não traduzidas (UTRs) 5' e 3'. (b) Representação esquemática da poliproteína, que é processada por proteases virais e do hospedeiro, originando as proteínas estruturais C, prM e E e as proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Perera and Kuhn, 2008).

Os vírus dengue possuem cerca de 50 nm de diâmetro e consistem de uma camada protéica externa e uma bicamada lipídica interna derivada do hospedeiro, as quais circundam o RNA genômico (Perera and Kuhn, 2008). O envelope viral possui duas proteínas transmembranas, a proteína de membrana M (8KDa) e a glicoproteína de envelope E (51-60 KDa), que formam homodímeros que se estendem sobre a superfície da partícula (Zybert et al., 2008).

A superfície dos virions é composta de 180 monômeros da glicoproteína E, os quais estão organizados em 90 dímeros. A conformação da proteína E é altamente dependente do pH, alternando de um arranjo dimérico onde as moléculas se colocam no mesmo plano da superfície do virion, o que fornece um aspecto de superfície lisa em pH levemente alcalino, até uma conformação trimérica das proteínas E, que se projetam da superfície do virion, o que ocorre sob o pH ácido encontrado no compartimento endossômico. Essas

características destacam a grande flexibilidade molecular da proteína E, a qual é importante para os passos da maturação viral e infecção da célula hospedeira. Essa flexibilidade é possível devido a uma região de dobradiça entre os domínios I e II, o loop kl (Modis et al., 2004; Murphy and Whitehead, 2011).

A glicoproteína de envelope E contém 12 resíduos de cisteína conservados, que formam seis pontes dissulfeto e contém os epítomos neutralizantes. Dentro de cada sorotipo a sequência da proteína E é conservada, o que sugere que apesar de se tratar de um vírus de RNA os vírus dengue não evoluem rapidamente. Isto é provavelmente devido, pelo menos em parte, à necessidade do vírus de ser eficientemente transmitido e de replicar em mais de um hospedeiro, o mosquito e o humano (Perera and Kuhn, 2008; Murphy and Whitehead, 2011).

De acordo com estudos de cristalografia de raio-X a proteína E possui em seu N-terminal três domínios estruturais ou funcionais: o domínio central (domínio I), que é formado por um barril- $\beta$  de oito cadeias; o domínio de dimerização que contém um peptídeo de fusão que catalisa a fusão das membranas viral e endossomal (domínio II) e o domínio de ligação ao receptor (domínio III), o qual consiste de um domínio do tipo imunoglobulina. O domínio II possui os epítomos com reação cruzada entre grupos e subgrupos de *Flavivirus*. Já os domínios I e III contêm principalmente os epítomos tipo específicos. Após a entrada dos virions através de endocitose mediada por receptor, há a fusão das membranas viral e do hospedeiro mediada pela proteína E sob as condições acídicas do endossomo (Kuhn et al., 2002).

Já a região C-terminal da proteína E possui duas alfa-hélices (EH1 e EH2) e dois domínios transmembrana na região de âncora que atravessa a bicamada lipídica. Estudos utilizando vírus da encefalite transmitida por carrapatos mostraram que ambas EH1 e EH2 estão envolvidas no passo de fusão durante a entrada dos vírus na célula, onde EH2 estabiliza o heterodímero prM/E e EH1 está envolvida na trimerização das proteínas E em ambiente ácido (Allison et al., 1999; Zhang et al., 2003).

Durante uma infecção natural, células da linhagem fagocitária mononuclear, como células dendríticas, macrófagos e monócitos são alvos

primários dos vírus dengue. No entanto, um receptor específico ainda não foi identificado (Wu et al., 2000; Jessie et al., 2004; Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

Interessantemente os vírus dengue infectam, além das células supracitadas, células do intestino médio dos mosquitos e também de outras partes do mosquito, diversas linhagens celulares humanas, murinas e de insetos. Isto sugere que os vírus devem interagir com um receptor ubíquo ou explorar mais de um receptor (Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

Várias proteínas celulares e carboidratos que agem como fatores de ligação têm sido identificados, e estas moléculas interagem com a proteína E. Esses fatores de ligação auxiliam na concentração do vírus na superfície da célula, o que resulta em um aumento no acesso aos receptores celulares específicos. Porém, tem sido mostrado que os vírus dengue provenientes de células de mosquito dependem da lectina do tipo C DC-SIGN para a entrada eficiente na célula hospedeira (Tassaneetrithep et al., 2003; Navarro-Sanchez et al., 2003). Em uma infecção natural os vírus são depositados na pele após a picada do mosquito. Células dendríticas são residentes da pele e expressam DC-SIGN em sua superfície e esta lectina é específica para resíduos de manose do tipo high, os quais estão presentes na superfície dos virions produzido em células de insetos (Rey, 2003).

Estudos iniciais indicaram que os vírus dengue interagem com o hospedeiro através da associação com moléculas de heparan-sulfato associadas à membrana (Chen, 1997). Essas moléculas reconhecem resíduos carregados positivamente presentes na proteína E, o que se acredita promover a concentração dos vírus na superfície da célula antes da interação com os fatores que medeiam a penetração viral. Alguns receptores já foram identificados além do DC-SIGN supracitado, como LSIGN presente nas células endoteliais do fígado e o receptor de manose nos macrófagos, que também são lectinas do tipo C (Tassaneetrithep et al., 2003, Miller, 2008). Porém, certos tipos celulares que não possuem estas moléculas em sua superfície são passíveis de infecção pelos vírus dengue.

Foi descoberto que as proteínas TIM e TAM, ambas receptores transmembrana que participam da fagocitose dependente de fosfatidilserina e na remoção de células que sofreram apoptose, são fatores que medeiam a entrada dos vírus da dengue. Foi proposto que as proteínas TIM interagem

diretamente com fosfatidilserina presente na superfície dos virions, enquanto as proteínas TAM ligam-se de maneira indireta a esses resíduos de fosfatidilserina, através de seus ligantes naturais Gas6 e ProS (Meertens, 2012). Dessa forma mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos moleculares que levam à infecção da célula hospedeira.

A interação entre as proteínas E e prM é o principal fator que dirige a montagem dos vírus (Junjhon et al., 2010). A proteína prM possui 166 aminoácidos e a clivagem na posição 91 resulta no peptídeo pr e na proteína M. A região C-terminal de prM contém um domínio em hélice (MH) e dois domínios transmembrana (Zhang et al., 2003). Além disso, prM auxilia no dobramento da proteína E e ambas estão integradas na bicamada lipídica do virion. Nos estágios finais da montagem viral na rede trans-Golgi, a proteína prM é clivada por furinas, o que resulta em um rearranjo das proteínas M e E na superfície do virion e é importante para a exposição do domínio de ligação ao receptor (Heinz and Allison, 2003).

Esta mudança conformacional na proteína E é disparada por baixo pH (5,8-6,0) e ocorre antes da clivagem da proteína prM. O peptídeo “pr” clivado permanece na partícula madura associado à proteína E até que a partícula viral seja liberada no pH neutro do ambiente extracelular. Especula-se que o peptídeo “pr” funcione como um *cap* que protege o peptídeo de fusão presente na proteína E de uma fusão prematura antes da liberação viral (Perera and Kuhn, 2008; Li et al., 2008).

Interessantemente, em um estudo foi demonstrado que a relação entre as proteínas prM e E dos vírus dengue é importante não somente para a manutenção da conformação correta de E, mas também para a síntese de prM. Tsai e colaboradores produziram as proteínas recombinantes prM, E e prM/E que possuíam as regiões C-terminal truncadas e observaram que na ausência de E ou da hélice C-terminal EH2 desta proteína houve uma expressão reduzida de prM, indicando que a região EH2 da proteína E afeta a expressão e a estabilidade da proteína prM (Tsai et al., 2012).

### 1.3. Prevenção e Diagnóstico

A busca pela vacina contra a dengue começou na década de 20 do século passado, com o uso de extrato de mosquitos *Aedes* infectados. As pesquisas se intensificaram durante a Segunda Guerra Mundial, com o uso de vírus atenuados por passagens sucessivas em células (Hombach, 2007). Porém, até o momento nenhuma vacina ou antiviral específico encontram-se disponíveis. A criação de uma vacina eficiente contra a dengue tem encontrado obstáculos como a situação sócio-econômica dos principais países afetados e o fenômeno do agravamento mediado por anticorpo, que leva a necessidade da criação de uma vacina tetravalente, o que faz a busca pela vacina mais complicada em relação a outros flavivirus, como vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa e vírus da encefalite transmitida por carrapatos (Ishikawa et al., 2014).

Apesar disso, o desenvolvimento de novas ferramentas de biologia molecular tem possibilitado a criação de diversos candidatos vacinais como vacinas de vírus vivos atenuados, nos quais ocorreram mutações dirigidas, o que aumenta a segurança da vacina; vacinas de vetores virais, vacinas de vírus inativados, vacinas de subunidades e vacinas de DNA (Wan et al., 2013), que se encontram em diferentes estágios de estudos clínicos e pré-clínicos. Vale lembrar que cada tipo de estratégia empregada na busca pelo desenvolvimento de um imunógeno eficaz contra a dengue possui vantagens e desvantagens inerentes, no que diz respeito à segurança, à imunogenicidade e à facilidade de produção para o desenvolvimento de um produto comercial (Coller et al., 2011).

Vacinas de vírus vivos atenuados possuem a capacidade de induzir respostas imunes adaptativas para as proteínas estruturais e não estruturais do vírus. Porém, a replicação deve ser restrita para evitar efeitos patológicos somada à reduzida transmissibilidade por mosquitos. Embora os resultados pré-clínicos sejam promissores, interferência e competição entre os sorotipos, que resultam em respostas imunes desiguais, dificultam o desenvolvimento dessas vacinas (Whitehead *et al*, 2007, Wan et al., 2013).

Na busca por uma vacina de vírus vivo atenuado contra a dengue, Zust e colaboradores produziram mutantes dos vírus dengue -1 e dengue-2, nos quais a atividade de 2'-O-metiltransferase, envolvida na metilação do Cap

presente na região 5' do genoma viral foi comprometida, o que gerou vírus nos quais a replicação era atenuada em camundongos e macacos *Rhesus*. Os candidatos vacinais foram estáveis *in vitro* e *in vivo* e induziram resposta imune adaptativa. Os macacos imunizados com uma única dose dos vírus em estudo mostraram completa soroconversão, além de serem protegidos durante o desafio com o sorotipo homólogo e incapazes de transmitir a doença durante a picada de mosquitos *Aedes* (Zust et al., 2013). Os resultados obtidos são promissores, porém a estratégia utilizada deve ser empregada para a criação dos mutantes para os sorotipos 3 e 4, a fim de determinar se haverá soroconversão para os quatro sorotipos e se a interferência viral será superada.

O candidato vacinal mais avançado nos estudos clínicos é a vacina desenvolvida pelo Instituto Sanofi Pasteur (ChimeriVax™). Trata-se de uma formulação tetravalente na qual foi utilizado a cepa atenuada do vírus da febre amarela Y17D expressando, separadamente, as proteínas estruturais prM e E dos quatro sorotipos dos vírus da dengue. Durante os estudos pré-clínicos e clínicos de fases I e II, a vacina induziu altos níveis de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos, além de soroconversão de 77% a 100% após a terceira imunização (Guy, 2010; Morrison et al., 2010). No entanto, durante estudos realizados na Tailândia a vacina mostrou baixa efetividade em relação ao sorotipo 2 (Sabchareon et al., 2012).

Dessa forma, apesar dos ótimos resultados apresentados pelo candidato vacinal ChimeriVax™, o fenômeno da interferência viral ainda deve ser superado. Neste ínterim, uma alternativa para evitar este fenômeno é a criação de vacinas de subunidades recombinantes. Essas vacinas estão entre as mais seguras, uma vez que não há problemas com atenuação inadequada ou reversão que potencialmente podem ocorrer durante o desenvolvimento de vacinas de vírus vivos atenuados ou mesmo uma inativação inadequada durante o desenvolvimento de vacinas de vírus inativados.

As vacinas de subunidades também possibilitam ajustes nas dosagens das proteínas dos quatro vírus dengue presentes na formulação visando alcançar níveis equivalentes dos anticorpos induzidos. Outra vantagem é o alto rendimento que pode ser alcançado, o que é importante sob o ponto de vista

econômico, dado que a vacina contra a dengue deve atender a uma grande parcela da população mundial (Clements et al., 2010; Collier et al., 2011).

Na busca pelo desenvolvimento de uma vacina de subunidade eficaz, Clements e colaboradores expressaram as proteínas E truncadas dos quatro sorotipos dos vírus da dengue utilizando como sistema de expressão células de *Drosophila* Schneider-2 (S2). As proteínas foram produzidas em suas conformações nativas, conforme demonstrado através de ensaios de ligação a anticorpos que reconhecem epítomos conformacionais e também através de cristalografia de raio-X. Quando combinados ao adjuvante ISCOMATRIX, os antígenos foram capazes de induzir fortes respostas de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos tanto em camundongos quanto em macacos (Clements et al, 2010).

Estes animais também foram imunizados com a proteína E recombinante do sorotipo 2 e desafiados para avaliar a capacidade de proteção da vacina. Em camundongos houve 100% de proteção após o desafio, enquanto nos primatas foi detectado algum grau de proteção, determinado pela diminuição da viremia no sangue destes animais. Ainda nos macacos foi observado um significativo aumento da produção de anticorpos neutralizantes após o desafio, indicando que houve a indução de memória imunológica (Clements et al., 2010). Porém deve ser levado em conta, apesar dos resultados promissores obtidos, que o sistema de expressão em células empregado é laborioso e caro.

Assim como as vacinas de subunidades, as vacinas de DNA não replicam em células o que permite a administração das mesmas em indivíduos imunocomprometidos, nos quais a administração de vacinas de vírus vivos atenuados é contra-indicada. Além disso, vacinas de DNA promovem a expressão *de novo* das proteínas dentro da célula, o que induz forte resposta imune celular (Durbin and Whitehead, 2011).

No entanto, as vacinas de DNA têm sido mais efetivas quando combinadas com outras estratégias de imunização, o que leva a um efeito sinérgico da resposta imune que pode reduzir o número de doses requerido para a proteção (Azevedo et al., 2013).

Dada a grande diversidade de sintomas que podem ser apresentados pelos indivíduos infectados, o diagnóstico de infecções pelos vírus dengue

através de ensaios laboratoriais é crítico para a determinação de características como o real número de casos, a cepa viral circulante em um dado momento em um local específico e também para a estimativa do número de casos totais durante uma epidemia. Além disso, o diagnóstico também se baseia em dados clínicos e epidemiológicos (Dutra et al., 2009; Blacksell et al., 2012).

O período ótimo para o diagnóstico da dengue é a partir do aparecimento da febre até o décimo dia após a infecção. Infelizmente, nem todos os pacientes são diagnosticados dentro deste período e assim um teste ideal deve ser sensível e específico independentemente do estágio da infecção (Peeling et al., 2010).

O diagnóstico laboratorial da dengue pode ser realizado por meio do isolamento viral de amostras de pacientes, detecção do genoma viral, detecção de antígenos virais, principalmente da proteína NS1, e estudos sorológicos. Testes sorológicos básicos têm sido usados para o diagnóstico da infecção pelo vírus, como teste de inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), teste de neutralização (TN), ELISA tipo captura e sanduíche (De Paula & Fonseca, 2004).

O isolamento viral a partir de amostras de pacientes pode ser realizado pela inoculação das amostras em mosquitos, em culturas de células de mosquitos, tais como células C6/36 e AP61 ou em células de mamíferos, como células Vero e LLC-MK2; bem como pela inoculação das amostras em cérebros de camundongos neonatos. Vale lembrar que as amostras são coletadas durante a fase aguda da doença. A detecção do genoma viral pode ser realizada através do teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) a partir de amostras de sangue total, soro ou mesmo de tecidos provenientes de pacientes infectados, estes últimos em casos fatais da doença (Peeling et al., 2010).

Dentre os estudos sorológicos, o ensaio de ELISA tem sido o mais amplamente utilizado. A dinâmica da infecção pelos vírus dengue é importante para a interpretação dos resultados obtidos em testes diagnósticos. Durante a fase inicial da infecção, os vírus replicam até alcançarem altos títulos no sangue, com a viremia alcançando seu máximo no tempo ou pouco depois do

aparecimento dos sintomas. Em infecções primárias, há uma resposta de IgM maior e mais específica do que durante infecções secundárias, com a detecção dos mesmos 3 a 5 dias após o aparecimento dos sintomas em infecções primárias (Peeling et al., 2010; Blacksell, 2012)..

Ainda em infecções primárias, a produção de anticorpos IgG específicos começa pouco depois da produção de anticorpos IgM, porém o título dessas imunoglobulinas, em contraste, é maior nas infecções secundárias do que em infecções primárias bem como sua detecção ocorre mais cedo, conforme mostra a figura 2. Anticorpos IgA específicos para os vírus dengue aparecem somente entre os dias 8 e 11 após o início da febre, porém seu uso como marcadores para o diagnóstico sorológico da dengue ainda requer maior validação (Peeling et al., 2010; Blacksell, 2012).

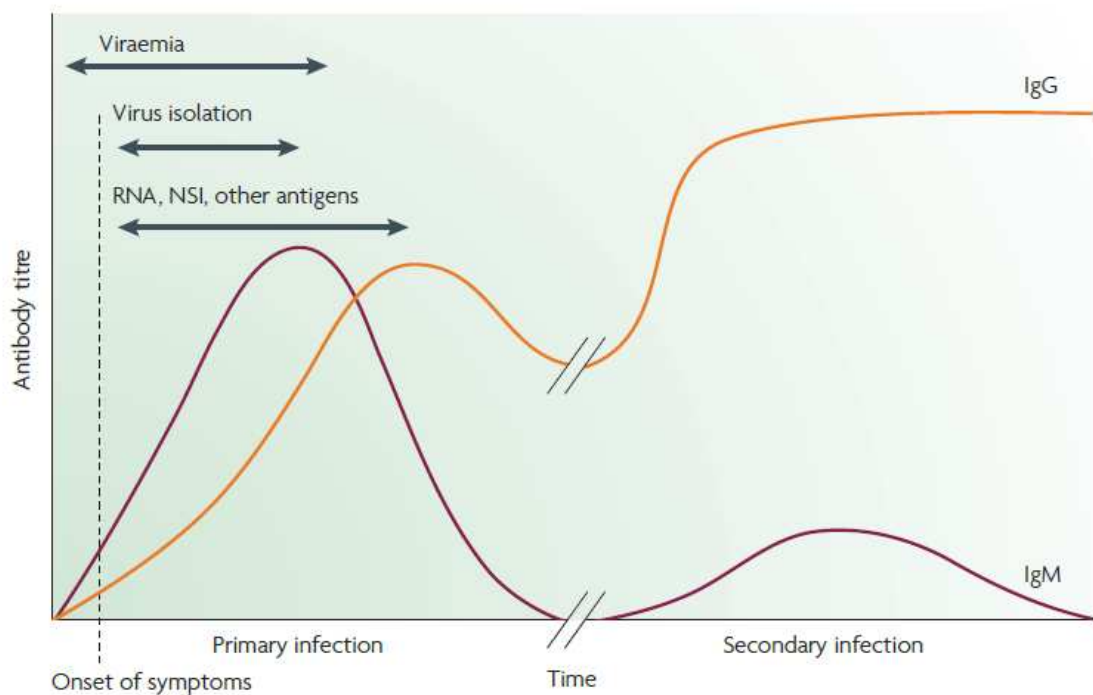


Figura 2: Níveis da proteína NS1 e dos anticorpos IgM, IgG e IgA em relação ao tempo em infecções primárias e secundárias pelos vírus dengue (Peeling et al., 2010).

A detecção de anticorpos IgG anti-dengue é muito utilizada para a classificação da infecção, ou seja, trata-se de uma infecção primária ou secundária devido à produção robusta desses anticorpos mesmo na fase aguda da doença em uma infecção secundária, porém estes anticorpos não

são muito específicos, podendo haver a detecção de reações cruzadas. A detecção de anticorpos IgM anti-dengue representa um dos maiores avanços para a pesquisa laboratorial da dengue. Neste ínterim, o ensaio MAC-ELISA, baseado na detecção específica de tais anticorpos no soro de pacientes por meio de sua captura por interação com anticorpos anti-IgM humano adsorvidos em fase sólida, fornece cerca de 10% de resultados falso-negativos e cerca de 1,7% de falso-positivos (Dutra et al.,2009).

Apesar da disponibilidade de diferentes técnicas laboratoriais para o diagnóstico da dengue, alguns obstáculos ainda devem ser superados para o aperfeiçoamento das mesmas e desenvolvimento de novas ferramentas, como a obtenção de antígenos dos vírus dengue em grande escala visando à captura de anticorpos específicos presentes em soros suspeitos.

Tradicionalmente, os antígenos utilizados em kits diagnósticos são aqueles provenientes de cultura de células ou de cérebro de camundongos neonatos infectados, o que faz a obtenção de antígenos em larga escala laboriosa e cara (Holmes et al., 2005; Dutra et al., 2009). Dessa forma, o uso de proteínas recombinantes em ensaios sorológicos para a detecção da dengue é uma boa alternativa, mas vale lembrar que a qualidade dos antígenos utilizados influencia diretamente a sensibilidade e a especificidade do teste empregado.

#### **1.4. Expressão de proteínas em leveduras**

Leveduras *Pichia pastoris* têm se tornado um importante organismo hospedeiro para a expressão heteróloga de proteínas. Esses micro-organismos são facilmente cultiváveis e alcançam altas densidades celulares, além de possuírem um eficiente sistema de secreção e muitas metodologias para a sua manipulação molecular estão disponíveis (Krainer et al., 2012).

*P. pastoris* são leveduras metilotróficas, ou seja, possuem a capacidade de utilizar metanol como fonte de carbono. Várias linhagens dessa levedura com uma ampla variedade de genótipos encontram-se disponíveis. A escolha da cepa utilizada depende da aplicação do produto obtido. Além disso, o sistema de expressão heteróloga em *P. pastoris* possui a capacidade de produzir grande parte das proteínas de forma estável e em geral apresentam melhores

rendimentos e demandam menos tempo e esforços quando comparados a outros sistemas de expressão eucarióticos como os baculovírus e células de mamíferos (Daly e Hearn, 2005; Cregg e Higgins, 1995).

Para a utilização do metanol como fonte de carbono, as leveduras *P. pastoris* possuem dois genes, *AOX1* e *AOX2*, os quais codificam enzimas com função de álcool oxidase. O primeiro gene possui um promotor mais forte o que pode ser visto pela quantidade de álcool oxidase produzida quando o metanol é utilizado como fonte de carbono, que é cerca de 30% do total de proteínas solúveis (Courdec and Baratti, 1980). Devido às características como a fina regulação dos promotores da álcool oxidase, a capacidade de indução desses promotores, bem como a alternativa de oxidação mais lenta de metanol através da indução do promotor *AOX2* mais fraco permitem o design de diferentes linhagens para proteínas heterólogas com propriedades específicas (Krainer et al., 2012).

Existem três fenótipos de *P. pastoris* no que se refere à utilização de metanol:  $Mut^+$ , onde ambos os genes *AOX* são ativos,  $Mut^S$  no qual o gene *AOX1* está ausente e  $Mut^-$  que não possui ambos os genes *AOX* e assim não suporta crescimento utilizando-se metanol como fonte de carbono (Cereghino and Cregg, 2000).

Dado que as proteínas recombinantes são produzidas utilizando a maquinaria da célula hospedeira eucariótica, a sua expressão em leveduras possui a vantagem de fornecer as condições para uma correta maturação pós-traducional (Daly e Hearn, 2005).

Recentemente nosso grupo de pesquisa expressou o domínio III da proteína de envelope E do vírus dengue-1 em leveduras *P. pastoris*. O produto obtido foi expresso de forma solúvel no sobrenadante da cultura, bem como possui potencial para uso em kits diagnósticos, uma vez que mostrou-se um bom antígeno em testes de ELISA utilizando-se soros de pacientes (Cardoso et al., 2013).

### **1.5 Virus - like Particles (VLPs)**

Uma interessante abordagem empregada nos últimos anos para a produção de proteínas virais é a expressão das proteínas estruturais sob a

forma de vírus-like particles (VLPs), que são estruturas proteicas semelhantes ao capsídeo viral sem material genético. VLPs possuem determinantes multiproteicos que podem mimetizar a organização e conformação dos virions (Shang et al, 2012). Assim, eles podem ser utilizados como modelos para estudos de mecanismos de entrada viral, montagem, além de interações entre vírus e seus hospedeiros (Grgacic and Anderson, 2006).

A utilização dos VLPs baseia-se na propriedade das proteínas estruturais de muitos vírus de montar-se em arranjos repetitivos após a expressão de seus genes em diferentes sistemas de cultura. Existem diferentes sistemas de produção de VLPs, como diversas linhagens de células de mamíferos, sistemas de expressão em células procarióticas, em células de insetos/baculovirus, em plantas e em leveduras, principalmente *Saccharomyces* e *P. pastoris*. A facilidade de expressão e o custo da produção têm feito este último sistema amplamente utilizado (Grgacic and Anderson, 2006).

Os VLPs possuem uma vantagem inerente sobre outros antígenos solúveis que muitas vezes falham em induzir potentes respostas imunes ou são instáveis, uma vez que essas partículas possuem os epítomos arranjados de forma repetitiva e dessa forma são apresentados em uma alta densidade e na conformação correta ao sistema imune. Além disso, os VLPs não são infecciosos e não replicam, o que representa uma alternativa segura à utilização de vírus atenuados, principalmente quanto ao uso em indivíduos imunocomprometidos (Grgacic and Anderson, 2006; Ludwig and Wagner, 2007).

Uma vez que possuem as proteínas estruturais virais de maneira tal que mimetizam os virions, os VLPs também podem ser utilizados como antígenos em testes diagnósticos. Isto é particularmente importante no caso da dengue, onde os antígenos tradicionalmente usados para diagnosticar a doença são aqueles advindos de culturas celulares infectadas ou de macerados de cérebros de camundongos neonatos.

Em um estudo realizado por Holmes e colaboradores, VLPs dos quatro sorotipos dos vírus dengue foram utilizados em testes de ELISA para a detecção de anticorpos específicos em soros de pacientes. Os resultados obtidos mostraram maior especificidade quando os VLPs foram utilizados em

comparação com os antígenos provenientes de cérebros de camundongos neonatos. Essa maior sensibilidade foi atribuída ao maior grau de pureza dos VLPs (Holmes et al.,2005).

Ainda em relação à dengue, diversos trabalhos buscam o uso dos VLPs como vacinas. Liu e colaboradores expressaram as proteínas prM e E do vírus dengue-2 em *P. pastoris*. As proteínas foram expressas na forma de VLPs com cerca de 30 nm e exibiram eficácia similar ao vírus dengue-2 inativado quando ambos foram utilizados para imunizar camundongos BALB/c (Liu et al., 2010).

A co-expressão das proteínas prM e E dos vírus dengue é o método mais utilizado para a produção de VLPs. Porém, em um estudo recente Mani e colaboradores produziram VLPs em leveduras *P. pastoris* somente a partir da expressão da proteína E. Análises de microscopia eletrônica revelaram a presença de discretos VLPs, que se mantiveram estáveis a 37°C por duas semanas. Além disso, os antígenos produzidos foram capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes em camundongos, bem como conferir proteção parcial frente ao desafio letal com o vírus dengue-2 (Mani et al., 2013).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A dengue é uma doença negligenciada que acomete grande parcela da população mundial, sendo um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Esta moléstia é causada pelos vírus dengue, o qual compreende quatro sorotipos igualmente capazes de causar todas as manifestações clínicas da doença.

As infecções por esses agentes patogênicos pode resultar desde infecções assintomáticas até quadros mais graves, como a febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue, que podem ser fatais.

Uma vez que antivirais específicos e medidas profiláticas eficazes são inexistentes, a criação de uma vacina contra a dengue é primordial para o combate a esta doença que acomete principalmente países em desenvolvimento. Soma-se a isso, a necessidade de testes diagnósticos rápidos e baratos que possibilitem a detecção da doença mesmo nas localidades mais afastadas dos grandes centros urbanos.

Um dos grandes obstáculos ao desenvolvimento de testes diagnósticos baratos e acessíveis é a obtenção de antígenos de qualidade e em larga escala. Assim, uma abordagem utilizada para a obtenção de tais antígenos é a utilização de proteínas virais recombinantes produzidas em diferentes sistemas de expressão.

Neste ínterim, o presente trabalho objetivou a obtenção das proteínas prM e E do vírus dengue-3 em grande escala a partir de leveduras *Pichia pastoris* e o uso das mesmas como imunógeno e também como antígenos em testes diagnósticos da dengue.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral:**

Expressar, purificar e avaliar as proteínas prM e E do vírus dengue-3 quanto ao seu uso como antígeno recombinante no diagnóstico da dengue e quanto à sua capacidade em gerar resposta imune em camundongos contra o vírus dengue-3.

### **3.2. Objetivos específicos:**

- Clonar os genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 no vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A;
- Expressar as proteínas recombinantes prM e E do vírus dengue-3 de forma solúvel em leveduras *Pichia pastoris* KM71H;
- Analisar as proteínas recombinantes obtidas quanto ao seu uso como antígenos em testes de ELISA;
- Avaliar a imunogenicidade das proteínas recombinantes obtidas em camundongos.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 4.1. Células e Plasmídeos

Células Vero foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina e antibióticos. O plasmídeo de clonagem utilizado foi o pTZ57R/T (InsTAclone™ PCR Cloning kit - Fermentas) e para a expressão das proteínas de interesse foi utilizado o plasmídeo pPICZαA (Invitrogen. CA, USA) (figuras 3 e 4). Leveduras *Pichia pastoris* da linhagem KM71H foram os hospedeiros utilizados para a expressão das proteínas de interesse. Nesta linhagem houve a perda do gene *AOX1*, sendo que apenas o *AOX2* é funcional. Dessa forma, essa linhagem é Mut<sup>S</sup>, ou seja, apresenta consumo reduzido do indutor metanol.

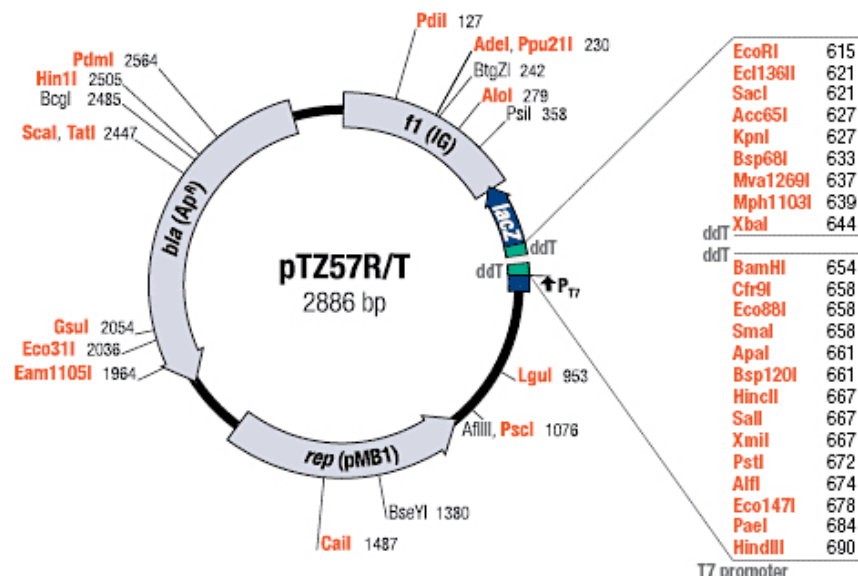


Figura 3: Mapa do vetor de clonagem pTZ57R/T.

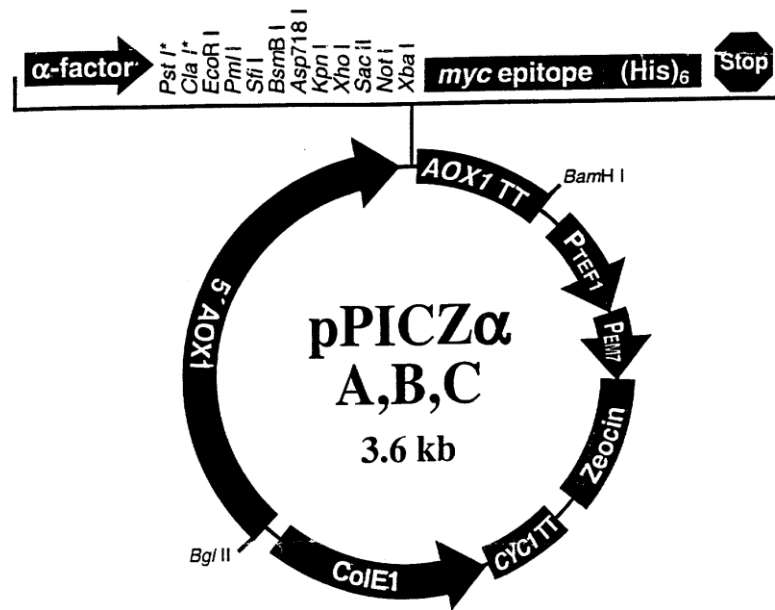


Figura 4: Mapa do vetor de expressão pPICZαA

#### 4.2 Estoques Virais

Os estoques virais utilizados neste estudo foram provenientes de macerados de cérebros de camundongos neonatos infectados com o vírus dengue-3 (cepa H-87, disponível no laboratório). Para isso, camundongos Swiss com três dias de vida foram inoculados por via intracerebral com o vírus dengue-3. Os animais foram monitorados diariamente até a observação do aparecimento dos sintomas de paralisia, geralmente após 4 a 5 dias de infecção, quando foram sacrificados e os cérebros extraídos com seringa de insulina (1,0 mL), macerados em PBS com 5% de soro fetal bovino e os sobrenadantes obtidos foram estocados a -70°C.

#### 4.3 Titulação Viral

Os estoques virais preparados conforme descrito anteriormente foram titulados. Para isso, células Vero na concentração de  $4,2 \times 10^4$  células/poço foram transferidas para placas de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, New York, USA). Após adesão das células, as mesmas foram infectadas, em

duplicata, com 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante proveniente do macerado de cérebro de camundongos neonatos, diluídos de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . Como controle negativo, foi adicionado PBS 1X. Após incubação durante 90 minutos sob agitação constante, foi adicionado 1,5 mL de meio MEM suplementado com 2% de SFB e 3% de carboximetilcelulose (SIGMA, Munich, Germany). As placas foram mantidas a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  durante 6 dias. Após esse período, foram retirados 500  $\mu\text{L}$  do meio semi-sólido de cada poço e acrescentado 1 mL de formaldeído 20%. Após 1 hora a 37 °C, o conteúdo dos poços foi descartado e lavado em água corrente. Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de cristal violeta (cristal violeta 5%, NaCl 0,25%, formaldeído 1,75% e etanol 50%). As placas foram incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente e lavadas em água corrente para contagem das placas de lise. Para o cálculo de unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL) foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{PFU/mL} = \frac{\text{Número de placas de lise}}{\text{Volume do inóculo (mL)} \times \log \text{ da diluição}}$$

#### 4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A fim de aumentar os níveis de expressão das proteínas de interesse em leveduras *P. pastoris* KM71H, as sequências das mesmas foram otimizadas segundo os códons preferenciais de leveduras e a sequência resultante foi obtida por síntese química pela empresa GenScript. As sequências otimizadas dos genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 foram amplificadas utilizando-se primers” específicos contendo os sítios para as enzimas de restrição EcoRI e NotI (Tabela 1), resultando em um fragmento de 1986 pb. Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados 100 ng de DNA, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada “primer” (sense e antisense), 0,2 mM de dNTPs, tampão da enzima 1X, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 1 unidade de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em 40 ciclos com as seguintes condições: 95 °C por 5 minutos, 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos, 72 °C por 90 segundos e 72 °C por 10 minutos. Os amplicons

foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com GelRed (Biotium) diluído 1:500 sob luz ultravioleta.

“Primer”	Sequência
prM/E S	5'GCGAATTCTTCCACTTGACATC3'
prM/E AS	5'GAGCGGCCGCGGCTTGAACAA3'

Tabela 1: Sequência dos “primers” utilizados para a amplificação dos genes sintéticos das proteínas prM e E do vírus dengue-3.

#### 4.5 Preparação de Bactérias Competentes

Bactérias *E. coli* TOP10F, estocadas a -70 °C em meio LB contendo 25% de glicerol foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB acrescido de tetraciclina (25 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 18 horas. Após isso, foi preparado um pré-inóculo a partir de uma colônia isolada em 5 mL de meio LB líquido sob agitação constante de 180 rpm por 16 horas. A cultura bacteriana foi diluída 1:100 em 500 mL de meio LB acrescido de tetraciclina (25 µg/mL) e incubada a 37 °C sob agitação constante de 180 rpm até atingir uma densidade óptica a 600 nm de 0,3. Em seguida, as células foram incubadas em gelo durante 5 minutos e centrifugadas a 1600 x g a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi cuidadosamente suspenso em 100 mL de tampão Ca<sup>+</sup>/glicerol gelado (60 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de Piperazina N’N’-bis[ácido 2-etanossulfônico] (PIPES) e 15% de glicerol, pH 7,0). As células foram centrifugadas a 1600 x g a 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida, as bactérias foram incubadas em gelo durante 30 minutos e centrifugadas novamente a 1600 x g a 4 °C por 5 minutos. O precipitado foi suspenso cuidadosamente em 12 mL de tampão Ca<sup>+</sup>/glicerol gelado e a solução foi dividida em tubos de microcentrifuga em porções de 250 µL. As alíquotas foram armazenadas a -70 °C até o uso.

#### 4.6 Inserção dos Genes Otimizados em Vetor de Clonagem

O produto da amplificação realizada conforme descrito anteriormente foi purificado do gel de agarose utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen), segundo as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada a clonagem do fragmento de interesse no vetor pTZ57R/T utilizando-se o kit InsTAclone™ PCR Cloning kit (Fermentas). Para a reação de ligação foram adicionados 3 µL do produto de PCR, 1 µL do vetor pTZ57R/T, 2 µL de 5X Ligation Buffer e 0,4 µL da enzima T4 Ligase (SIGMA, Munich, Germany). Após incubação a 25 °C por 1 hora, o produto da reação de ligação foi usado para transformar bactérias *E. coli* TOP10F competentes pelo método do choque térmico. Para isso, as alíquotas de células foram descongeladas em banho de gelo e 5 µL da reação de ligação foram adicionados às células, que foram mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 42 °C por exatamente 30 segundos e rapidamente ao gelo novamente. Foram adicionados 800 µL de meio SOC seguido de incubação a 37 °C sob agitação constante de 150 rpm por 1 hora. Após agitação, 100 µL da cultura foram semeados em placas contendo LB/ágar 1,5% contendo antibióticos (tetraciclina 25 µg/mL e ampicilina 100 µg/mL) com auxílio de uma alça de Drigalski, até esgotar toda a suspensão na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas (modificado de Sambrook et al,1989). As colônias obtidas nas placas de transformação foram posteriormente crescidas e processadas para isolamento do DNA plasmidial.

#### 4.7 Análise do DNA Plasmidial Extraído das Colônias Transformadas

As colônias bacterianas obtidas após a transformação com o produto da reação de ligação foram submetidas à extração de DNA plasmidial utilizando-se o método da lise alcalina com modificações. Dessa forma, as colônias foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) e tetraciclina (25 µg/mL) e crescidas a 37 °C durante 18 horas em agitador a 200 rpm. Em seguida, 1,5 mL das células foram sedimentadas a 10000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado mais 1,5 mL da cultura bacteriana, que foi novamente centrifugada. O precipitado obtido foi suspenso em 200 µL de TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM). Em seguida foi

adicionado 360  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo NaOH 0,2 M e SDS 1% e os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos. Após isso, foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo acetato de potássio 5 M e 11,5% de ácido acético glacial, os tubos foram mantidos no gelo durante 5 minutos e centrifugados por 5 minutos a 10000 x g. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e foi adicionado 750  $\mu\text{L}$  de isopropanol seguido de homogeneização. A suspensão foi centrifugada a 10000 x g por 5 minutos, o sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado foi suspenso em 200  $\mu\text{L}$  de TE acrescido de RNase (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após 30 minutos a 37 °C, foram adicionados 110  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5 M e o tubo foi agitado vigorosamente, seguido de centrifugação a 10000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 750  $\mu\text{L}$  de etanol 100%. Após nova centrifugação a 10000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e suspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. O DNA plasmidial obtido foi submetido aos ensaios de PCR e restrição dupla para confirmação da inserção dos genes de interesse no vetor de clonagem.

#### **4.8 Ensaio de Restrição Enzimática**

A fim de confirmar a clonagem dos genes otimizados das proteínas prM e E do vírus dengue-3 no vetor pTZ57/RT, os plasmídeos extraídos conforme no item anterior foram submetidos à uma reação de digestão dupla. Para tal, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  do plasmídeo, 0,5  $\mu\text{L}$  de EcoRI (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), 0,5  $\mu\text{L}$  de NotI (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), 2  $\mu\text{L}$  de tampão H e 7  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. As misturas foram incubadas durante 16 horas a 37 °C. Os produtos foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com GelRed (Biotium) diluído 1:500.

#### **4.9 Clonagem dos Genes Otimizados das Proteínas prM e E no Vetor de Expressão pPICZ $\alpha$ A**

Após a recuperação do fragmento de 1986 pb proveniente da dupla digestão supracitada utilizando-se o kit QIAquick Extraction Gel kit (Qiagen), o mesmo foi ligado ao vetor pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen, CA, USA). Para isso, o vetor foi

digerido com as enzimas de restrição EcoRI e NotI, conforme descrito no item anterior. Para a reação de ligação, foram adicionados, obedecendo a proporção de 3:1 entre inserto e vetor, 1  $\mu$ L do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A, 3,5  $\mu$ L do inserto, 2  $\mu$ L do tampão da enzima, 0,4  $\mu$ L da enzima T4 Ligase (SIGMA, Munich, Germany) e 3,1  $\mu$ L de água ultrapura. A reação foi incubada a 25 °C durante 1 hora e o produto foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* TOP10F competentes, conforme descrito no item 3.6. Os transformantes foram selecionados em meio LB com baixa concentração de sal contendo 25  $\mu$ g/mL do antibiótico Zeocin. As colônias foram então submetidas à extração de DNA plasmidial, conforme descrito no item 3.7 e os plasmídeos obtidos foram submetidos à reação de digestão dupla com as enzimas de restrição EcoRI e NotI (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), conforme já especificado para a verificação da inserção do fragmento de interesse no vetor de expressão.

#### **4.10 Transformação de Leveduras *Pichia pastoris* KM71H**

Após a confirmação da clonagem dos genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 no vetor pPICZ $\alpha$ A, o plasmídeo contendo o inserto foi digerido com a enzima de restrição SacI (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). O produto da digestão foi utilizado para transformar leveduras *P. pastoris* KM71H através de eletroporação. Para isso, as leveduras foram crescidas em 5 mL de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) por 16 horas sob agitação constante de 200 rpm a 30 °C. A cultura obtida foi inoculada em 500 mL de YPD em uma diluição de 1:100 e incubada novamente a 30 °C e 200 rpm até atingir uma densidade óptica a 600 nm de 1,3. As células foram então centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C e suspensas em 500 mL de água gelada estéril. Após nova centrifugação, as leveduras foram suspensas em 250 mL de água gelada estéril e novamente centrifugadas. O precipitado foi suspenso em 20 mL de sorbitol 1 M gelado e após centrifugação a 1500 x g a 4 °C as células foram suspensas em 1 mL de sorbitol 1 M gelado e mantidas no gelo. Para a transformação, 80  $\mu$ L das leveduras eletrocompetentes foram misturados com 20  $\mu$ g do plasmídeo contendo o inserto previamente linearizado com SacI e transferidos para uma

cubeta de eletroporação gelada. A cubeta contendo a mistura foi mantida no gelo por 5 minutos e após isso as células foram pulsadas utilizando-se os parâmetros para *Saccharomyces cerevisiae*. Imediatamente foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M gelado na cubeta e o conteúdo foi transferido para um tubo de 15 mL estéril. As leveduras foram então incubadas a 30 °C por duas horas e semeadas em placas de YPD contendo 100 µg/mL, 200 µg/mL ou 500 µg/mL de Zeocin. As placas foram incubadas a 30 °C por 2 dias até o aparecimento de colônias. Para a confirmação da transformação das leveduras, foi realizada uma PCR das colônias. Uma vez que a amplificação do fragmento de 1986 pb foi uma grande dificuldade encontrada até o momento, para a verificação de transformantes optamos pela amplificação de um fragmento menor de 408 pb correspondente à região codificadora do domínio III da proteína E do vírus dengue-3 também otimizado. Também foi feita uma PCR utilizando-se primers específicos para a região do gene *AOX1*, com o intuito de verificarmos a correta inserção dos genes em estudo. As sequências dos primers utilizados são mostradas na tabela 2. Os clones positivos foram crescidos em 3 mL de meio YPD por 24 horas e armazenados a -70 °C em meio YPD contendo 20% de glicerol.

<b>“Primer”</b>	<b>Sequência</b>
<b>Domínio III S</b>	5'TCACAAGAAGGTGCCATGCAC3'
<b>Domínio III AS</b>	5'AGACAACCTCAAAGCCTTTTC3'
<b>AOX1 S</b>	5'GACTGGTTCCAATTGACAAGC3'
<b>AOX1 AS</b>	5'GCAAATGGCATTCTGACATCC3'

Tabela 2: Sequência dos “primers” do domínio III da proteína E do vírus dengue-3 otimizado e do *AOX1*, utilizados para a verificação da correta transformação das leveduras com o plasmídeo recombinante.

#### **4.11 Purificação das proteínas prM e E do vírus dengue-3 em coluna de níquel**

Para a purificação das proteínas de interesse, as leveduras transformadas foram crescidas em 5 mL de meio YPD a 30 °C por 24 horas.

Após esse período as células foram inoculadas em 250 mL de meio BMGY pH 6,0 (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 1.34% de YNB, 0.002% de biotina, 100 mM de fosfato de sódio e 1% de glicerol), mantidas a 30 °C e 200 rpm por cerca de 3 dias, até atingirem uma densidade óptica a 600 nm de 20. Em seguida a cultura foi centrifugada a 3000 x g por 20 minutos e o precipitado foi lavado com água contendo 1% de extrato de levedura e 2% de peptona, seguido de suspensão em 100 mL de meio BMMY pH 6,0 (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 1.34% de YNB, 0.002% de biotina, 100 mM de fosfato de sódio e 1% de metanol) e as células foram mantidas a 30 °C e 200 rpm. A cada 12 horas a expressão das proteínas de interesse era induzida com 1% de metanol. Ao final de 5 dias de indução, a cultura foi centrifugada a 3000 x g por 20 minutos e o sobrenadante obtido foi centrifugado novamente a 7000 x g por 20 minutos para análises posteriores. Para a purificação das proteínas, o sobrenadante da cultura foi diluído 1:1 com tampão de ligação pH 8,0 (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl), filtrado em membrana de 0,45 µm e submetido à purificação proteica mediante cromatografia de afinidade, utilizando-se uma coluna HisTrap FF de 1 mL previamente equilibrada com tampão de ligação, acoplada ao sistema de purificação AKTA Prime Plus (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). Um volume de tampão de ligação correspondente a 10 vezes o volume da coluna foi passado através da mesma para remover proteínas que interagiram de maneira não específica com a coluna. As proteínas ligadas especificamente foram recuperadas através da aplicação na coluna de um tampão de eluição (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl e 300 mM de imidazol). As frações que obtiveram maiores valores de absorvância a 280 nm foram misturadas e analisadas através de SDS-PAGE 10% e Western Blot.

#### **4.12 Análise das frações obtidas na cromatografia de afinidade**

As frações provenientes da purificação cromatográfica foram analisadas quanto ao seu perfil protéico através de eletroforese em gel de poliácridamida a 10% na presença de duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Sambrook et al., 1989). Para isso, 4 µL do tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, uréia 4M), tanto redutor como não redutor,

foram adicionados a 20  $\mu$ L do “pool” das frações e as misturas foram incubadas a 100 °C por 5 minutos. As amostras e o marcador de peso molecular foram aplicados em géis de poliacrilamida e a eletroforese foi conduzida em solução tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 0,12 M e SDS 0,1% pH 8,3) a 190 V. As bandas protéicas foram visualizadas mediante coloração do gel com Comassie Blue. Para o Western Blot, as proteínas após serem separadas eletroforeticamente foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas durante duas horas a temperatura ambiente com tampão salina fosfato (PBS) (0,1 M NaCl, 2mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4) contendo 5 % de leite desnatado. Após lavagens com PBS-Tween 20 0,5%, foram incubadas com anticorpo anti-His Tag mAb (Sigma, USA) por 1 hora a 37 °C. Depois de lavadas como descrito, as membranas foram incubadas por uma hora a 37 °C com o anticorpo anti-IgG de camundongos marcados com fosfatase (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) diluídos 1:10000 em PBS. Após lavagem com PBS-Tween 20 0,5 %, as membranas foram reveladas com 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) conforme as especificações do fabricante para a visualização da banda de interesse.

#### **4.13 Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para investigar se as proteínas prM e E estavam sendo expressas sob a forma de “vírus-like particles” (VLPs). Dessa forma, o sobrenadante da cultura de leveduras processado conforme já descrito foi submetido a uma ultracentrifugação em gradiente de sacarose (5% a 50%) a 153 000 x g a 4 °C por 6 horas. As frações foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Uma alíquota de 10  $\mu$ L das mesmas foi adicionada a uma grid de 200 mesh previamente coberta com FormVar (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) por 5 minutos. O excesso de líquido foi removido com papel de filtro, e as grids foram cobertas com 10  $\mu$ L de acetato de uranila 2% por 20 segundos. As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany) operando a 80 kV.

#### **4.14 Purificação das proteínas prM e E recombinantes através de precipitação com sulfato de amônio**

Para a purificação das proteínas recombinantes em estudo, submetemos o sobrenadante da cultura processado conforme descrito a uma precipitação com concentrações de saturação crescentes de sulfato de amônio. Para tal, foi adicionado lentamente ao sobrenadante 20% de saturação de sulfato de amônio (p/v), seguido de incubação em repouso a 4 °C durante 24 horas. Após isso, o tubo foi centrifugado a 4 °C e 2500 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado lentamente sulfato de amônio numa concentração de 40%-60% de saturação (p/v). Novamente o sobrenadante foi mantido em repouso a 4 °C por 24 horas e centrifugado. O sobrenadante obtido foi coletado e misturado lentamente ao sulfato de amônio em uma concentração de 60-80% de saturação (p/v). Após nova incubação, o sobrenadante foi descartado e os precipitados foram recolhidos e suspensos em 3 mL de água ultrapura e armazenados a 4 °C. As frações obtidas foram então analisadas mediante SDS-PAGE 12 %, conforme descrito no item 3.12 e Western Blot. Para o Western Blot, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante duas horas a temperatura ambiente com tampão salina fosfato (PBS) (0,1 M NaCl, 2mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4) contendo 5 % de leite desnatado. Após lavagens com PBS-Tween 20 0,5 %, foram incubadas com um “pool” de soros de pacientes confirmados com dengue diluídos 1:50 em PBS 1X por 1 hora a 37 °C. Depois de lavada como descrito, a membrana foi incubada por uma hora a 37 °C com uma mistura de anticorpos anti-IgM e anti-IgG humanos marcados com peroxidase (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) diluídos 1:10000 em PBS. Após lavagem com PBS-Tween 20 0,5 %, as membranas foram reveladas com 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) conforme as especificações do fabricante para a visualização da banda de interesse. O conteúdo protéico nas respectivas frações foi avaliado pelo método de Bradford.

#### **4.15 ELISA indireto**

Para a realização do ensaio de ELISA indireto, soros de 184 pacientes foram fornecidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública do estado de

Rondônia (LACEN/RO) e pelo Banco Central de Sangue do estado de Rondônia (FHEMERON/RO). Todos os soros foram testados previamente em acordo com os protocolos aprovados pelo Banco Central de Sangue do estado de Rondônia e todas as amostras foram mantidas anônimas. As amostras coletadas foram encaminhadas para o Instituto Adolfo Lutz e enviadas para os Laboratórios de Virologia Molecular da FMRP – USP e de Imunovirologia Molecular da UFV. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e referendado pela Secretária de Saúde do Município de Ribeirão Preto. Das 184 amostras, 46 eram positivas para IgG contra a dengue e 46 eram negativas, usando Dengue Duo IgM e IgG ELISA Capture kits; 92 eram positivas para a presença de IgM contra a dengue e 46 eram negativas para IgM, quando testadas pelos kits MAC-ELISA IgM (Pan-Bio, Australia) e Dengue Duo IgM e IgG ELISA Capture Kits (Sanofi, NJ, USA). As frações provenientes das precipitações com 20% e 60-80% de sulfato de amônio foram usadas em um estudo retrospectivo a fim de avaliar a capacidade dos antígenos produzidos em testes diagnósticos. Para isso, placas de poliestireno de 96 poços (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes. Foram utilizados 5 µg/well de proteínas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, com incubação a 4 °C por 16 horas. As placas foram bloqueadas com PBS contendo 5% de soro fetal bovino por 30 minutos. Amostras dos soros foram diluídos 1:100 em PBS – soro fetal bovino 5% e 100 µL de cada diluição foi adicionado aos poços em duplicada. Após incubação a 37 °C por duas horas, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20 0,5% e foi adicionado anticorpo anti-IgG ou anti-IgM humano conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) diluído 1:2500 em PBS-soro fetal bovino 5%. As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora. Após cinco lavagens conforme já descrito, foi adicionado o substrato 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A reação foi parada mediante adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. A leitura das placas foi realizada em um espectrofotômetro multicanal com um filtro de 450 nm (Multiskan, Thermo Scientific, USA).

## **4.16 Avaliação do potencial imunogênico das proteínas prM e E recombinantes**

### **4.16.1 Imunização dos animais**

As proteínas recombinantes foram avaliadas quanto à sua capacidade de induzir resposta imune ao vírus dengue-3 em camundongos C57BL/6. Os animais foram adquiridos junto ao biotério central da UFV, conforme aprovação prévia junto ao comitê de ética da mesma instituição (CEUA), processo 69/2013. Para isso, os animais com 8 semanas de vida foram separados em 3 grupos de 5 animais e imunizados 3 vezes por via intraperitoneal em intervalos de 15 dias. O primeiro grupo recebeu somente PBS juntamente com Adjuvante de Freund completo, o segundo foi imunizado com vírus dengue-3 inativado por 30 minutos a 56 °C juntamente com Adjuvante de Freund completo e o terceiro grupo recebeu 50 µg de proteínas recombinantes por animal (25 µg da fração de 20% de saturação de sulfato de amônio e 25 µg da fração de 60-80% de saturação de sulfato de amônio), juntamente com Adjuvante de Freund completo. Para as imunizações subsequentes foi utilizado Adjuvante de Freund incompleto para todos os grupos. Para o grupo imunizado com as proteínas recombinantes, foram utilizados 30 µg (15 µg da fração de 20% de saturação de sulfato de amônio e 15 µg da fração de 60-80% de saturação de sulfato de amônio) das proteínas recombinantes durante as imunizações. Antes de cada imunização, o sangue destes animais foi coletado através da punção do saco retro-orbitário, processados para a separação dos soros e armazenados a -20 °C para análises posteriores. Após as 3 imunizações os animais foram sacrificados, os baços coletados e os esplenócitos foram cultivados para a realização dos ensaios de imunofenotipagem, linfoproliferação e análise de expressão de citocinas.

### **4.16.2 Processamento do baço dos animais imunizados**

Após os animais serem sacrificados, os baços foram coletados em 2 mL de meio RPMI-1640 estéril e macerados. Após centrifugação a 1200 x g por 10 minutos a 4 °C, o precipitado foi suspenso em 4 mL de tampão de lise de

hemácias gelado ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,16M e Tris-HCl 0,7M pH 7,5) com incubação por 7 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas duas lavagens com 10 mL de meio RPMI-1640. O precipitado resultante foi suspenso em 1 mL de meio RPMI-1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino e as células foram contadas em câmara de Neubauer.

#### **4.16.3 Linfoproliferação**

Para avaliar a proliferação dos linfócitos frente ao estímulo com o vírus dengue-3 foi utilizado o protocolo do MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide). Os esplenócitos foram cultivados em placas de 96 wells na concentração de  $0,5 \times 10^6$  células por poço juntamente com 0,5 MOI do vírus dengue-3. Para o controle negativo foi utilizado meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e para o controle positivo, a concavalina A (0,2  $\mu\text{g/ml}$ ). Após 44 horas de cultura a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  foi feita adição de 5  $\mu\text{g/ml}$  de MTT em PBS, homogeneizado por 5 min a 150 rpm e incubado a 37 °C por 4 horas. O produto do metabolismo do MTT (Formazan) foi suspenso em 200  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO), homogeneizado por 5 min a 150 x g até completa solubilização e a leitura da absorvância feita a 560 nm. A densidade óptica é diretamente correlacionada com a quantidade de células viáveis.

#### **4.16.4 Imunofenotipagem das células do baço dos animais imunizados**

A fim classificar fenotipicamente os esplenócitos provenientes dos animais imunizados, foi realizada uma citometria de fluxo. Os anticorpos utilizados neste ensaio foram anti-CD44-PE Cy7, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD19-FITC e anti-CD62L-PE Cy5. 5, adquiridos junto à eBioscience. Para tal,  $1 \times 10^5$  células dos baços dos animais foram adicionadas a 1  $\mu\text{L}$  dos respectivos anticorpos marcados e as células foram incubadas no escuro a temperatura ambiente por 2 horas. Após incubação, o volume dos tubos foi completado para 1 mL seguido de centrifugação a 1500 x g por 10 minutos e as células foram suspensas em 1 mL de PBS. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo FACSVerse (BD).

#### 4.16.5 Análise da expressão de citocinas por Real Time PCR

Para determinar o padrão de resposta imune desenvolvido frente ao vírus dengue-3, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time PCR) para a quantificação de mRNAs das citocinas IFN- $\gamma$  (padrão Th-1), IL-4 e IL-10 (padrão Th-2). Para tal, células provenientes dos baços dos animais imunizados foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de  $5 \times 10^6$  células por poço juntamente com 0,5 MOI de vírus dengue-3. Novamente, como controle negativo foi utilizado meio RPMI-1640 e como controle positivo as células foram estimuladas com Concanavalina-A (0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após seis horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , o meio das células foi cuidadosamente retirado e foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de TRI Reagent (Sigma, Munich, Germany). As placas foram mantidas a  $-70^\circ\text{C}$ . Para a extração do RNA, após descongelamento, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Após isso, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio com incubação de 15 minutos a temperatura ambiente seguida de centrifugação a  $12000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Depois de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, as preparações foram centrifugadas a  $12000 \times g$  por 8 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado, seguido de adição de 1 mL de etanol 75% e incubação a  $-70^\circ\text{C}$  por 12 horas. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a  $7500 \times g$  por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , o sobrenadante descartado e o “pellet” suspenso em 20  $\mu\text{L}$  de água ultrapura após incubação a  $56^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Para a síntese do cDNA, 1  $\mu\text{g}$  do RNA extraído foi incubado a  $65^\circ\text{C}$  por 5 minutos com 100 pmol de “primer” randômico. Em seguida a mistura foi mantida no gelo por 2 minutos e após breve centrifugação foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  de 10X Reaction Buffer, 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 200 unidades de Transcriptase Reversa (Vivantis) em uma reação de 20  $\mu\text{L}$ . Após incubação a  $42^\circ\text{C}$  por 60 minutos, a reação foi paralisada após os tubos serem mantidos a  $0^\circ\text{C}$ . Para a avaliação da expressão de citocinas, foi feita uma Real Time PCR onde a quantificação dos mRNAs das citocinas em estudo foi comparada à expressão do gene constitutivo da  $\beta$ -actina. As sequências dos primers utilizados são descritas na tabela 3. Para a reação, foram utilizados 400 ng de cDNA, 400 nM de cada “primer” (sense e anti-sense), 10  $\mu\text{L}$  de Fast EvaGreen Master Mix para uma reação de 20  $\mu\text{L}$ . As

reações foram realizadas utilizando-se o Eco Real-time System (Illumina, California, USA).

<b>“Primer”</b>	<b>Sequência</b>
<b>B-actina S</b>	5' TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC 3'
<b>B-actina AS</b>	5' TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG3'
<b>IFN-<math>\gamma</math> S</b>	5' GCTCTGAGACAATGAACGCT3'
<b>IFN-<math>\gamma</math> AS</b>	5' AAAGAGATAATCTGGCTCTGC 3'
<b>IL-10S</b>	5' CAATAACTGCACCCACTTCCC 3'
<b>IL-10 AS</b>	5' GAGAAATCGATGACAGCGCCT 3'
<b>IL-4 S</b>	5' TATGCGAAGCACCTTGGAAGC 3'
<b>IL-4 AS</b>	5' CTGACGGCACAGAGCTATTGA 3'

Tabela 3: Sequência dos “primers” utilizados para amplificação dos genes de  $\beta$ -actina, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10.

#### 4.16.6 Imunofluorescência indireta

Com o objetivo de analisar se as proteínas recombinantes em estudo eram capazes de induzir respostas de anticorpos específicos em camundongos, foi realizado um ensaio de imunofluorescência indireta utilizando-se os soros dos animais imunizados. Para isso, células Vero foram cultivadas em lamínulas de vidro posicionadas em placas de 24 poços em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço. Após 24 horas, as células foram infectadas com  $2 \times 10^5$  PFU do vírus dengue-3. As células foram mantidas sob agitação lenta e constante por 1 hora. Após isso, foi adicionado 1 mL de meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino em cada poço e as células foram mantidas a 37°C por 1 hora. As células foram então fixadas com 200  $\mu$ L de acetona gelada por 15 minutos e foram adicionados 100  $\mu$ L dos soros dos camundongos diluídos 1:50 em PBS 1X em cada poço. Após 1 hora a 37°C, as células foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos cada lavagem com PBS1X. Em seguida foram adicionados 30  $\mu$ L do anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com FITC diluído 1:100 e PBS 1X e incubado por 1 hora a 37°C. Após

três lavagens conforme já descrito, as células foram então contra-coradas com DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) por 5 minutos e depois mais três vezes lavadas com PBS 1X durante 5 minutos. As lamínulas foram então montadas sobre uma lâmina de vidro e levadas para visualização ao microscópio de fluorescência.

#### **4.16.7 Reação de Neutralização em placas (PRNT)**

Para verificar se houve a indução de anticorpos neutralizantes nos animais imunizados foi utilizado o teste de neutralização em cultura conforme descrito por Lennette & Schmidt (1979). Dessa forma, os soros foram diluídos em meio MEM sem suplementação de soro fetal bovino (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 e 1/1024) e misturados a 1 volume de uma diluição vírus dengue-3 contendo  $5 \times 10^3$  PFU/mL. A mistura foi incubada a 37°C por 90 minutos e 100 µL de cada diluição foi adicionada em duplicata aos poços de uma placa de 24 poços na qual células Vero, na concentração de  $1 \times 10^6$  células, haviam sido previamente semeadas. Após incubação por 60 minutos sob agitação lenta e constante, foi adicionado meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino e 3% de carboximetilcelulose. As placas foram mantidas a 37 °C por 6 dias e coradas conforme descrito no item 3.3 para a visualização das placas de lise. O título de anticorpos neutralizantes foi estabelecido como o inverso da maior diluição do soro em que houve redução de 50% das placas de lise em relação aos poços que receberam somente o vírus dengue-3.

#### **4.16.8 Determinação da Dose Letal 50 (DL50)**

A fim de determinar a dose do vírus dengue-3 capaz de matar cinquenta por cento dos animais, camundongos C57BL/6 foram infectados por via intracraniana com o vírus dengue-3 nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . Os animais foram observados diariamente durante 21 dias para registro de morte.

#### **4.16.9 Ensaio de Proteção Pós-Desafio**

Para avaliar a capacidade de conferir proteção das proteínas recombinantes em estudo frente ao desafio com o vírus dengue-3, camundongos C57BL/6 foram imunizados 3 vezes por via intraperitoneal em

intervalos de 15 dias, com as preparações já especificadas no item 3.16.1. Após 15 dias da última imunização os animais foram desafiados por via intracerebral com a diluição de  $10^{-1}$  ( $10^4$  PFU) do vírus dengue-3 e observados diariamente por 21 dias para registro de sobrevivência.

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 Titulação Viral

O título viral presente na suspensão proveniente do cérebro de camundongos neonatos obtido foi de  $2 \times 10^6$  PFU/mL.

## 5.2 Clonagem das sequências dos genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 no vetor de clonagem pTZ57R/T

A fim de aumentar os níveis de expressão das proteínas em estudo, as sequências das proteínas prM e E do vírus dengue-3 foram otimizadas pela utilização dos códons preferenciais de leveduras e adquiridos junto à empresa GenScript. A sequência obtida é apresentada na figura 5. As sequências foram posteriormente submetidas a uma reação em cadeia da polimerase (PCR), cujo resultado da amplificação é apresentado na figura 6. A banda de 1986 pb foi excisada do gel e clonada no vetor pTZ-57R/T. Os plasmídeos recombinantes foram identificados após a liberação do inserto mediante digestão enzimática com as enzimas de restrição EcoRI e NotI, conforme mostrado na figura 7.

```
CATATGTTCCACTTGACATCCAGAGACGGTGAACCTAGAATGATAGTTGGTAAAAATGAAAGAGGTAAAAGTTTGTGTTTAA
GACTGCTTCCGGTATAAATATGTGTACATTGATCGCTATGGATTTGGGTGAAATGTGTGATGACACTGTAACATACAAGTGCCC
ATTGATTGCAGAAGTGAACCTGAAGATATAGACTGTTGGTGCAATTTGACCTCTACTTGGGTTACTTACGGTACATGTAACC
AAGCAGGTGAACATAGAAGAGATAAAAGATCAGTAGCTTTGGCACCACACGTCGGTATGGGTTTAGACACAAGAACCCTAAAC
TTGGATGTCGGCTGAAGGTGCATGGAGACAAGTTGAAAAAGTAGAAAACATGGGCTTTGAGACATCCAGGTTTTACCATATTG
GCATTATTCTTGGCCCACTATATCGGTACCTCTTTGACTCAAAAGGTTGTAATCTTTATTTTGTGATGTTGGTTACACCTTCAA
TGACCATGAGATGTGTCGGTGTGGTAATAGAGATTTCGTGCAAGGTTTGTGTCAGGTGCCACTTGGGTTGACGTCGTTTTAGA
ACATGGTGGTTGCGTTACTACAATGGCTAAAAACAAGCCAACTTGGATATTGAATTACAAAAGACTGAAGCTACCCAATTGG
CAACTTTGAGAAAGTTGTGTATCGAAGGTAAAATCACAATATTACCACTGGTTCTAGATGCCCAACCCAAGGTGAAGCAATA
TTGCCTGAAGAACAAGATCAAACTACGTTTGTAAAGCATAACATCGTAGACAGAGGTTGGGGTAAACGGTTGCGGTTTTGTTT
GTAAAGGTTCTTTAGTTACTTGTGCTAAGTTCGAATGCTTGGAAACCAATAGAGGGTAAAGTAGTCCAATACGAAAATTTGAAGT
ACACAGTTATTATAACTGTACACACAGGTGACCAACCACAAGTTGGTAACGACACTCAAGGTGTAACAGTCGAAATTACCCCT
CAAGCATCCACTGTGCAAGCCGTTTTGTTAGAATACGGTACATTAGGTTTTGAAATGTAGTCCAAGAACAGGTTTGGATTTCAA
CGAAATGATATTGTTGACCATGAAACTAAGGCCTGGATGGTTCATAGACAATGGTTTTTCGATTTGCCATTGCCTTGGACAA
GTGGTGCTACAACCGAAACACCTACCTGGAACAGAAAGGAATTTGTTGTTACTTTTAAAGAACGCCCATGCTAAAAAGCAAGA
AGTTGTAGTCTTGGGTTCTCAAGAAGGTGCCATGCACACAGCTTTAACCGGTGCAACTGAAATCAAAATTTCTGGTGGTACA
TCAATTTTTGCAGGTCACTTGAAGTGTAGATTGAAGATGGATAAGTTGGAATTGAAGGGCATGTCTATGCTATGTGCTTGAA
CACTTTTCGTCTTGAAGAAAGAGTTAGTGAACCTCAACATGGTACAATCTTGATCAAAGTTGAATACAAGGGTGAAGATGCTC
CATGTAATAATCCTTTTTCAACAGAAGACGGTCAGGGTAAAGCTCACAATGGTAGATTAATAACCGCAAAACCCAGTTGTAAC
AAAAAGGAAGAACCTGTTAACATCGAAGCAGAACCACCTTTCCGGTGAATCCAACATTGTTATAGGTATCGGTGACAAGGCC
TGAAGATTAATTGGTACAAAAAGGGTTCTTCAATCGGTAAAATGTTTGAAGCAACTGCCAGAGGTGCCAGAAGAATGGCTATT
TTAGGTGACACAGCTTGGGACTTCGGTCTGTAGGTGGTGTCTTGAACCTATTGGGTAAAATGGTTCATCAAATATTCCGGTTC
TGCCTACACTGCTTTGTTCTCCGGTGTAGTTGGATCATGAAGATAGGTATCGGTGATTGTTGACCTGGATTGGTTAAATTC
CAAGAACACTAGTATGCTCTTTCTGTATCGTTATCGGTATTATCACTTTGATTTGGGTGCTGTTGTTCAAGCCGAATTC
```

Figura 5: Sequência dos genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 otimizada para expressão em leveduras e adquirida por síntese química.

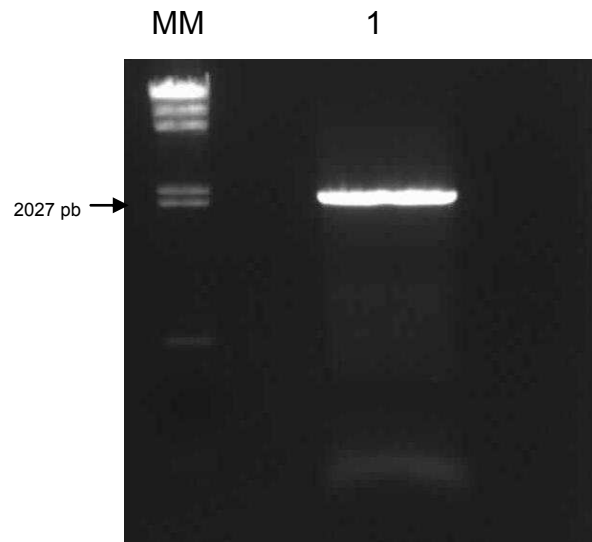


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto de amplificação dos genes sintéticos. MM - marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III; 1 - fragmento de 1986 pb correspondente aos genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 otimizados.

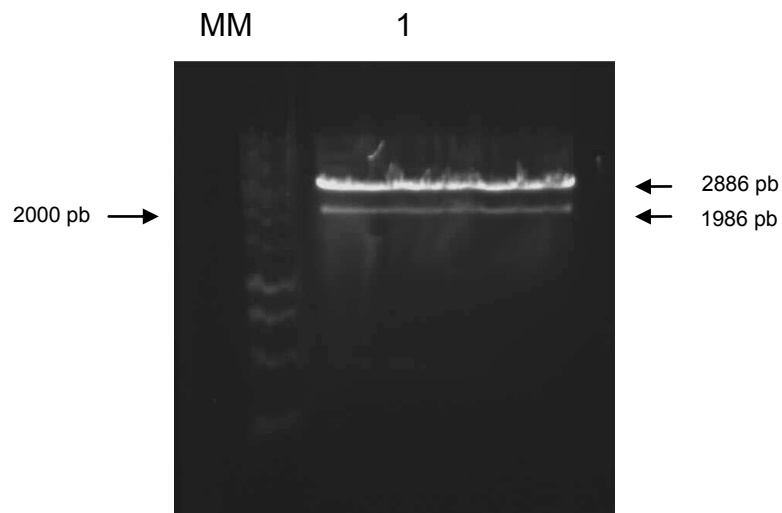


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto da digestão com as enzimas *Eco*RI e *Not*I do plasmídeo pTZ57R/T contendo os genes prM e E sintéticos. MM - marcador de peso molecular de 1 kb DNA Leader (Invitrogen, CA, USA); 1 - fragmento de 1986 pb correspondente aos genes das proteínas prM e E e o fragmento de 2886 pb correspondente ao vetor pTZ57R/T.

### 5.3 Clonagem dos genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 no vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A

Após purificação do fragmento de DNA de 1986 pb, o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A foi submetido à digestão enzimática com as enzimas EcoRI e NotI e recuperado do gel de agarose 0,8%. O inserto foi clonado no vetor de expressão e os plasmídeos recombinantes contendo o DNA de interesse foram identificados após ensaio de digestão dupla usando as enzimas de restrição EcoRI e NotI, conforme mostra a figura 8.

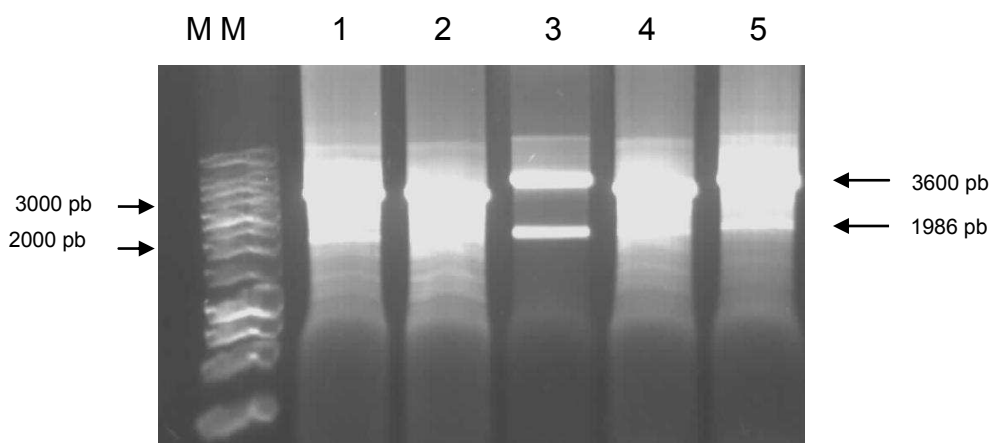


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos das digestões com as enzimas EcoRI e NotI do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A contendo os genes sintéticos. MM - marcador de peso molecular de 1Kb DNA Leader (Invitrogen, CA, USA); 1 a 5 - fragmentos de DNA de 1986 pb correspondente aos genes prM e E otimizados e fragmentos de 3600 pb correspondentes ao vetor.

### 5.4 Transformação de leveduras *Pichia pastoris* KM71H com os genes de interesse

Após a confirmação da ligação do inserto no vetor de expressão, a construção foi digerida com a enzima de restrição SacI, conforme mostra a figura 9, e o produto linearizado foi utilizado para transformar leveduras *P. pastoris* KM71H através de eletroporação. Os transformantes foram selecionados em meio YPD sólido contendo concentrações crescentes do antibiótico Zeocin

(Invitrogen, CA, USA) (100 µg/mL, 200 µg/mL e 500 µg/mL). A transformação das leveduras foi confirmada mediante realização de uma reação de PCR das colônias obtidas, utilizando os “primers” para o domínio III da proteína E otimizado e também a correta inserção dos genes no genoma da levedura em estudo foi verificada através reação de amplificação com “primers” para a região *AOX1* do genoma do micro-organismo hospedeiro, conforme indica a figura 10.

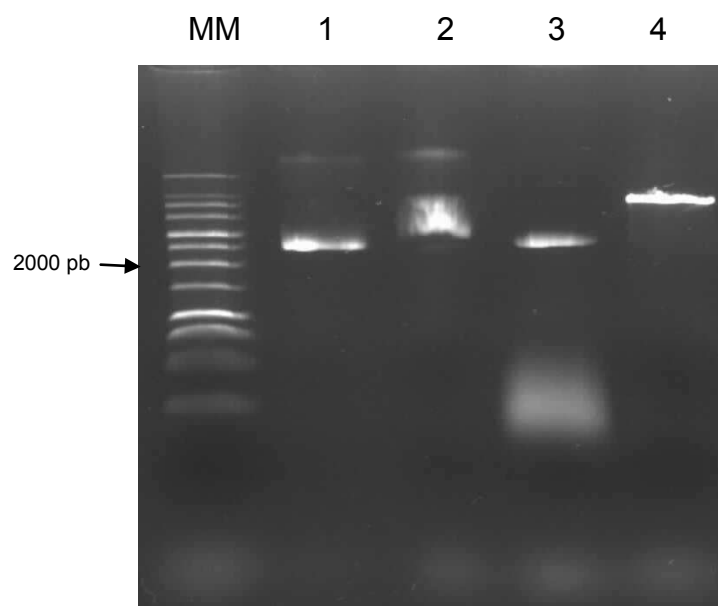
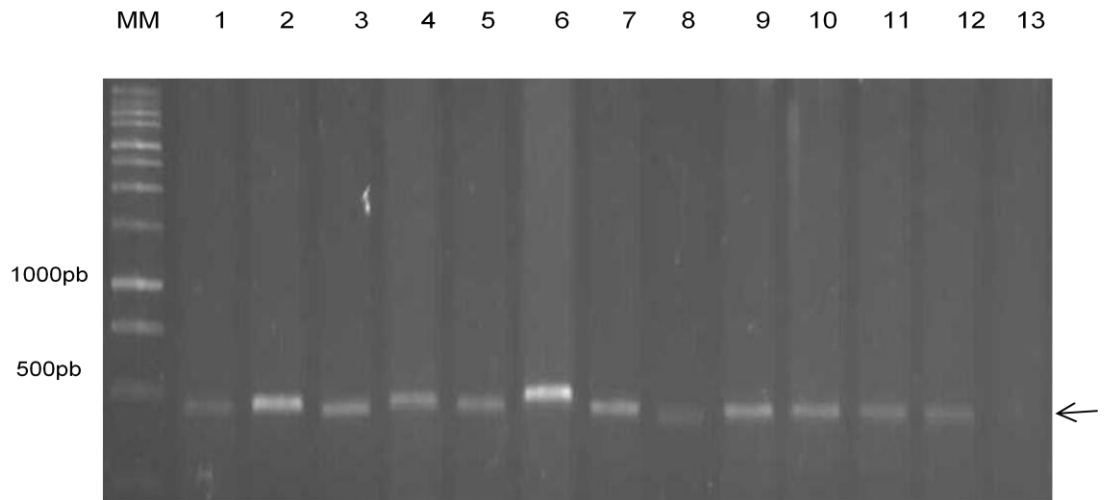


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão com *SacI*. MM - marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen, CA, USA); 1 a 3 - fragmentos de DNA de 3600 pb correspondentes aos plasmídeos pPICZ $\alpha$ A digeridos com *SacI*; 4 - fragmento de 5586 pb correspondente ao vetor contendo os genes das proteínas prM e E otimizados.

(A)



(B)

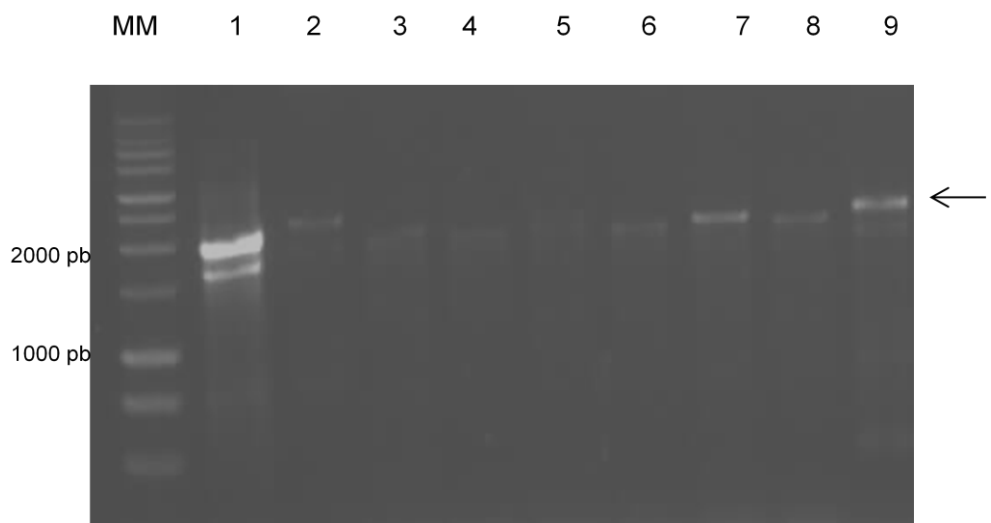


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de colônia das leveduras *P. pastoris* KM71H. Em (A) foram utilizados “primers” para o domínio III da proteína E do vírus dengue-3. 1 a 12 - amplicom de 408 pb referente ao domínio III do vírus dengue-3; 13 - controle negativo; MM - marcador de peso molecular de 1 kb. Em (B) foram utilizados “primers” para *AOX1*. MM - marcador de peso molecular de 1 kb; 1 a 9 - amplicon de 2300 pb, confirmando a correta transformação das leveduras com os genes prM e E do vírus dengue-3.

### 5.5 Purificação e caracterização das proteínas prM e E do vírus dengue-3 produzidas em *P. pastoris* em coluna de níquel

Após a confirmação da transformação das leveduras *P. pastoris* KM71H com o plasmídeo recombinante, as leveduras foram crescidas em 5 mL de meio YPD por 24 horas e inoculadas em meio BMGY, sendo cultivadas durante 3 dias e transferidas para o meio BMMY, com indução de 1% de metanol a cada 12 horas. Após isso, o sobrenadante da cultura foi submetido à purificação proteica por cromatografia de afinidade. As frações obtidas foram analisadas quanto ao perfil proteico por SDS-PAGE a 10%. Conforme mostra a figura 11, a banda de cerca de 50 kDa correspondente à proteína E foi mais forte nas frações total e não ligante, o que indicou que o método de purificação empregado foi pouco eficiente. A fim de determinar o melhor tempo de indução, foram retiradas alíquotas da cultura de leveduras após 3, 4 e 5 dias de indução. Conforme demonstrado na figura 12, depois de 5 dias de indução foi encontrado um discreto aumento no rendimento das proteínas obtidas após purificação em coluna de níquel, com aumento na intensidade da banda de cerca de 50 kDa, correspondente ao tamanho da proteína E. Dessa forma, o tempo de indução de 5 dias foi estabelecido para os ensaios posteriores.

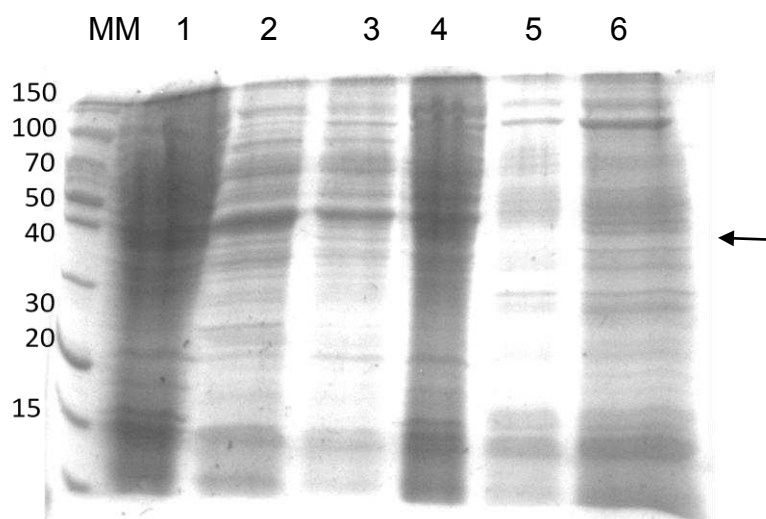


Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% do sobrenadante da cultura de leveduras após indução com metanol. MM - marcador de peso molecular; 1 e 2 - sobrenadante não purificado; 3 e 4 - fração não ligante na

coluna de afinidade; 5 e 6 - fração ligante ligante na coluna de afinidade. A seta indica a banda de 50 kDa correspondente ao peso molecular da proteína E.

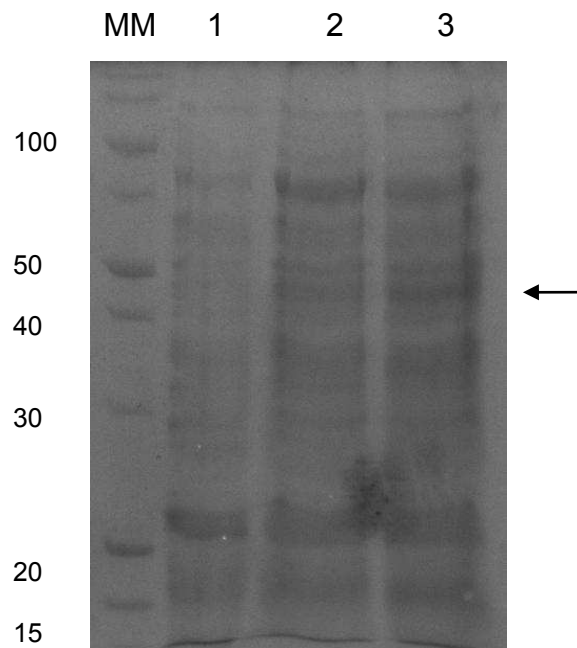


Figura 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% das frações ligantes na coluna de afinidade. MM - marcador de peso molecular; 1 - proteínas purificadas por cromatografia de afinidade após 3 dias de indução com metanol; 2 - proteínas purificadas por cromatografia de afinidade após 4 dias de indução; 3 - proteínas purificadas por cromatografia de afinidade após 5 dias de indução. A seta indica a banda com peso molecular de aproximadamente 50 KDa correspondente à proteína E.

A fim de comprovar que a banda de cerca de 50 kDa presente no gel de poliacrilamida realmente corresponde à proteína E, foi realizado um Western blot utilizando-se anticorpo contra a cauda de histidina (anti-His Tag) da fração ligante. Como esperado, a banda observada correspondia à proteína e recombinante, como mostrado na figura 13.

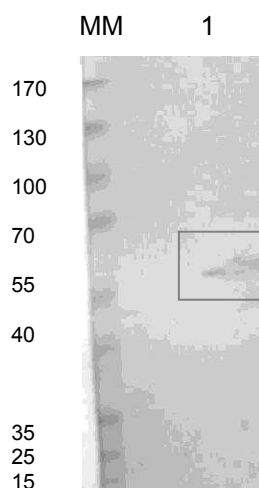


Figura 13: Western blot da fração ligante utilizando anticorpo anti- His Tag. MM - marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo, USA); 1 - banda de cerca de 50 kDa correspondente à proteína, conforme destacado.

### **5.6 Ultracentrifugação do sobrenadante da cultura de leveduras em gradiente de sacarose**

Uma vez que a purificação cromatográfica das proteínas prM e E recombinantes não foi satisfatória, verificamos se as proteínas estavam sendo expressas sob a forma de “vírus-like particles” (VLPs), o que poderia dificultar a purificação em coluna de níquel devido ao fato de que durante o dobramento conformacional a cauda de histidina codificada pelo plasmídeo poderia não encontrar-se exposta. Dessa forma, o sobrenadante da cultura foi submetido à uma ultracentrifugação em gradiente de sacarose de 5% a 50%. As frações foram então analisadas em SDS-PAGE 10%, conforme demonstrado na figura 14, onde pode ser notada a presença de uma banda de cerca de 50 kDa correspondente ao peso molecular da proteína E.

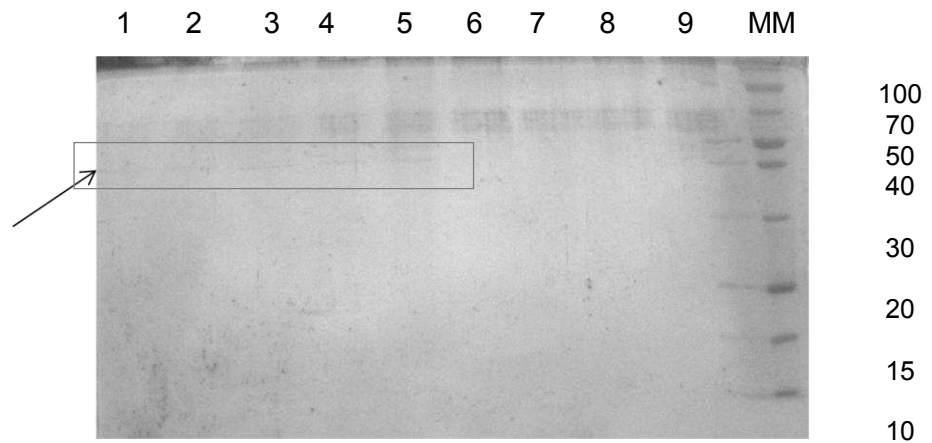


Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% das frações obtidas após ultracentrifugação do sobrenadante da cultura das leveduras transformadas em gradiente de sacarose. MM - marcador de peso molecular; 1 a 9 - perfil proteico da frações 17 a 25 (nesta ordem). A seta evidencia a banda de cerca de 50 kDa correspondente à proteína E, presente nas frações 17 a 21.

### 5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As frações oriundas da ultracentrifugação em gradiente de sacarose foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão. Conforme mostra a figura 15, foram observados estruturas semelhantes a VLPs de cerca de 20 nm presentes no sobrenadante da cultura das leveduras transformadas, o que torna mais provável a hipótese levantada anteriormente.

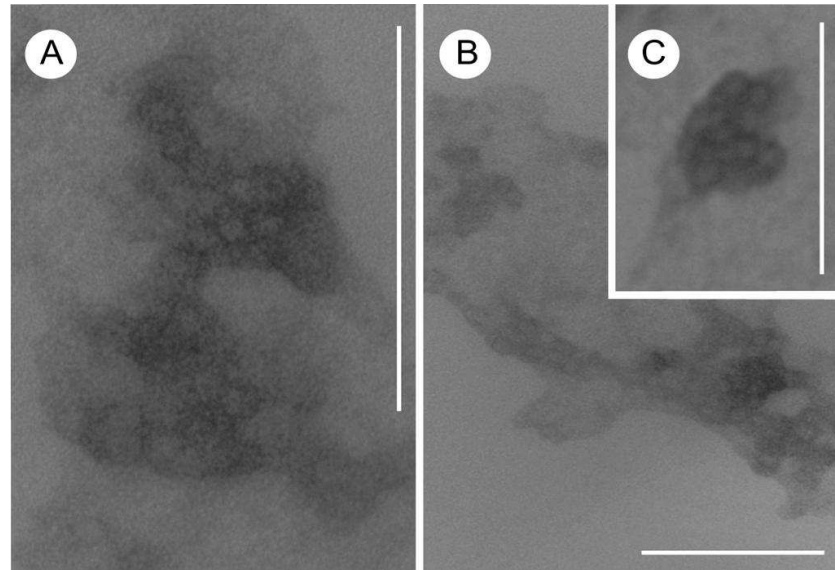


Figura 15: Micrografia do sobrenadante da cultura de *P. pastoris* transformadas com os genes prM e E do vírus dengue-3. A, B e C mostram os VLPs agregados após ultracentrifugação em gradiente de sacarose. A barra de escala corresponde a 200 nm.

### 5.8 Purificação das proteínas recombinantes a partir de precipitação com sulfato de amônio

Como alternativa para a obtenção das proteínas de interesse, uma vez que a purificação pelo método cromatográfico não foi satisfatória, foi utilizado o método de purificação de proteínas através da precipitação com sulfato de amônio. Para isso, as leveduras *P. pastoris* contendo os genes de interesse foram crescidas em meio BMGY para acúmulo de biomassa seguido de cultivo em meio BMMY e induzidas com 1% de metanol a cada 12 horas durante cinco dias. O sobrenadante da cultura foi processado conforme descrito na sessão 3.11 e submetido à precipitação com concentrações crescentes de sulfato de amônio (20%-80%). As frações obtidas foram avaliadas mediante eletroforese, conforme mostrado na figura 16 e analisadas através de Western Blot utilizando-se soro de pacientes confirmados com dengue, o que evidenciou a presença de uma banda de aproximadamente 50KDa em todas as frações (figura 17). As frações foram submetidas à dosagem proteica pelo método de Bradford e a fração de 20% possuía uma concentração protéica de 4,2 µg/mL, a fração de 40-60% possuía 2,4 µg/mL de proteínas, enquanto na fração de 60-

80% a concentração protéica era de 6,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Além disso, foram também observadas bandas de menor peso molecular, que pode corresponder à proteína prM não processada.

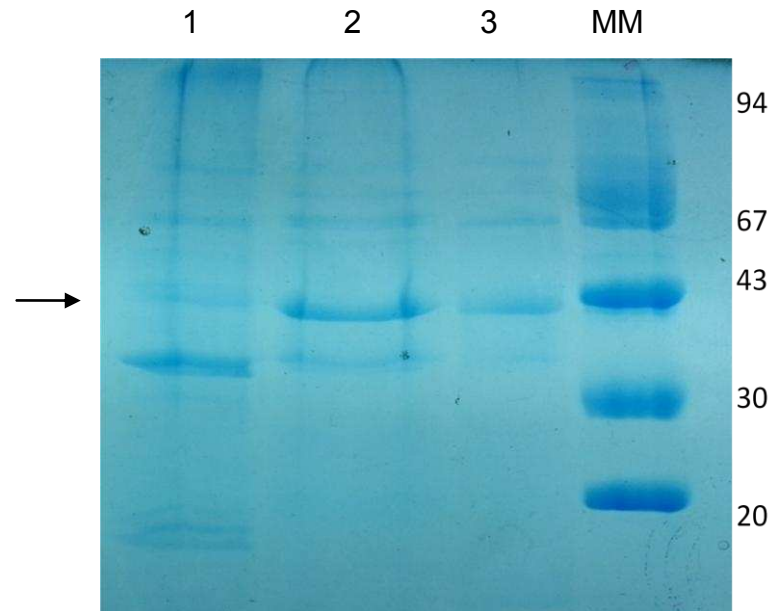


Figura 16: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% das frações provenientes das precipitações do sobrenadante das leveduras transformadas após indução com metanol. MM - marcador de peso molécula; 1 - fração proveniente da precipitação com 60-80% de sulfato de amônio; 2 - fração proveniente da precipitação com 40-60% de sulfato de amônio; 3 - fração proveniente da precipitação com 20% de sulfato de amônio. A seta indica a banda de cerca de 50 kDa correspondente à proteína E do vírus dengue-3.

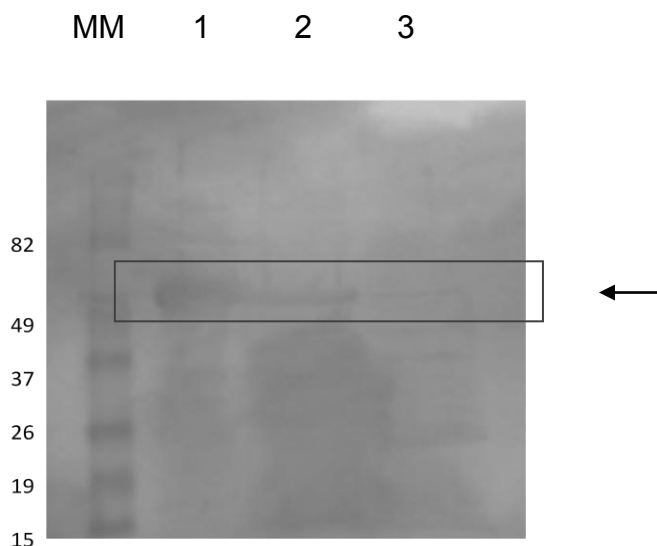


Figura 17: Western Blot das frações provenientes das precipitações com as concentrações de 20% (1), 40%-60% (2) e 60-80% (3) de saturação de sulfato de amônio utilizando-se soro de pacientes confirmados com dengue. As bandas de aproximadamente 50 kDa correspondente a proteína E são observadas em todas as frações, conforme indicado pela seta. MM - marcador de peso molecular.

### 5.9 ELISA indireto

As frações provenientes das precipitações com 20% e 80% de sulfato de amônio foram utilizadas como antígenos para a sensibilização de placas de 96 poços para o ensaio de ELISA indireto em um estudo retrospectivo com soros de pacientes, como demonstrado nas figuras 18 e 19. A fração de 20% forneceu um teste para a detecção de anticorpos IgM anti-dengue cuja sensibilidade foi de 73,91% e a especificidade foi de 82,61%, com *cut off* de 0,5740. Já a fração oriunda da precipitação com 60-80% de sulfato de amônio mostrou-se mais satisfatória como antígeno para detecção da dengue, com uma sensibilidade de 82,61% e especificidade de 89,25%, com *cut off* de 0,2138 para o ensaio de determinação da presença de IgM anti-dengue nos soros analisados. Para o ensaio de IgG, os resultados obtidos utilizando-se a mesma fração foram sensibilidade de 76,09% com especificidade de 84,78% e *cut off* de 0,1043.

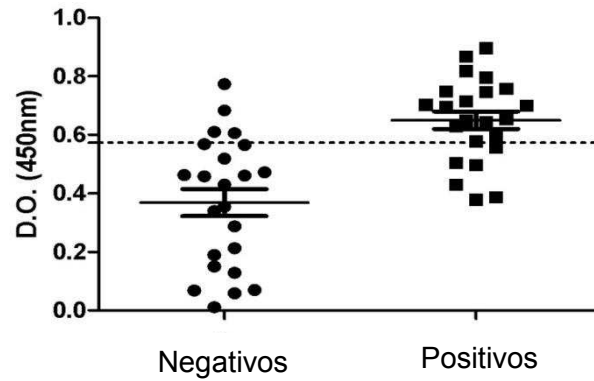


Figura 18: ELISA indireto para a detecção de anticorpos IgM anti-dengue em soros de pacientes utilizando a fração de 20% oriunda da precipitação com sulfato de amônio como antígeno. A linha horizontal indica o valor de *cut off* do ensaio. Foram obtidos 73,91% de sensibilidade e 82,61% de especificidade.

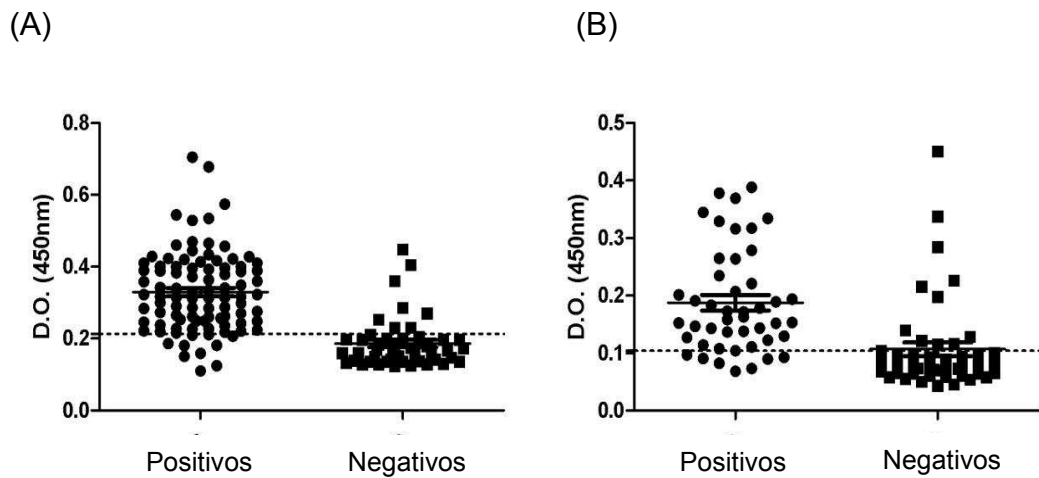


Figura 19: ELISA indireto para a detecção de anticorpos IgM e IgG anti-dengue em soros de pacientes utilizando-se a fração proveniente da precipitação com 60-80% de sulfato de amônio como antígeno. A linha horizontal indica o valor *cut off* do ensaio. Foram obtidos os valores de 82,61% de sensibilidade e 89,25% de especificidade para o ensaio de IgM (A), e 76,09% de sensibilidade e 84,78% de especificidade para a detecção de IgG (B).

## 5.10 Análise do potencial imunológico das proteínas prM e E recombinantes

### 5.10.1 Imunofenotipagem das células dos baços dos animais imunizados

A fim de caracterizar fenotipicamente as células dos baços dos animais imunizados com as frações provenientes das precipitações com 20% e 60-80% de saturação de sulfato de amônio, os esplenócitos foram marcados com anticorpos específicos e avaliados por citometria de fluxo. Como demonstra a figura 20, não houve diferença no número de células B entre os três grupos em estudo.

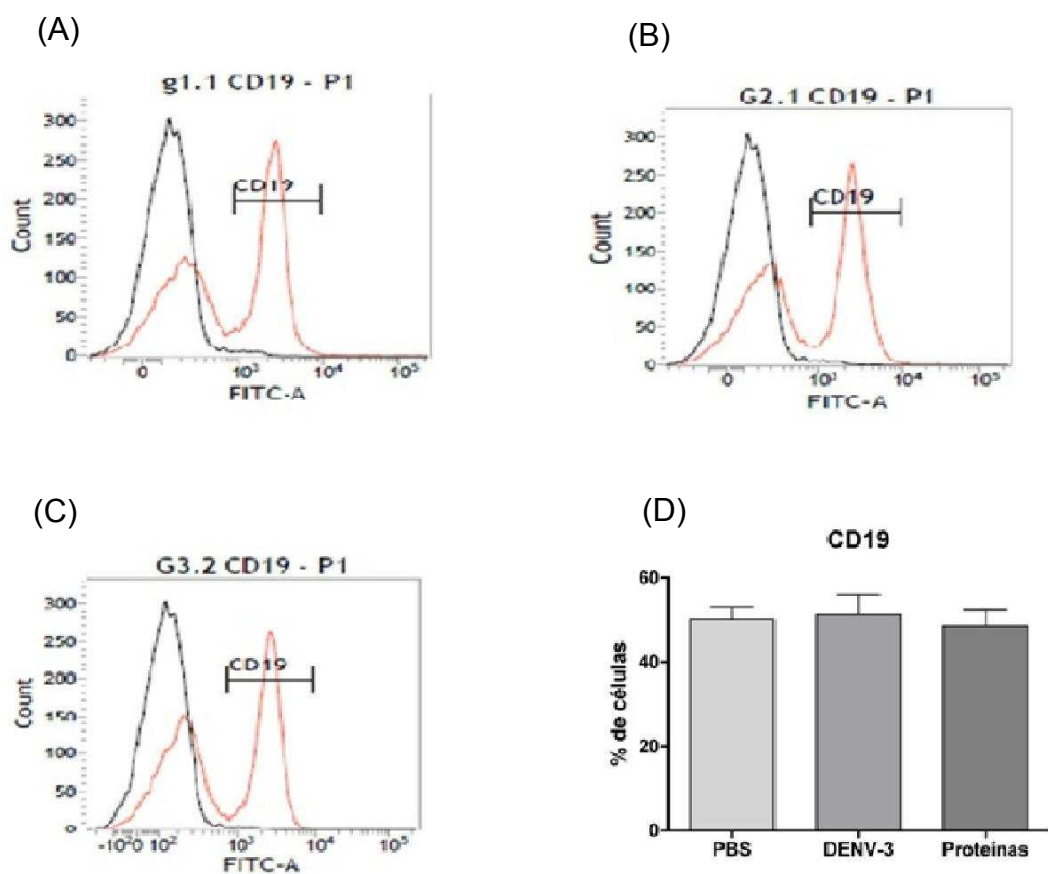
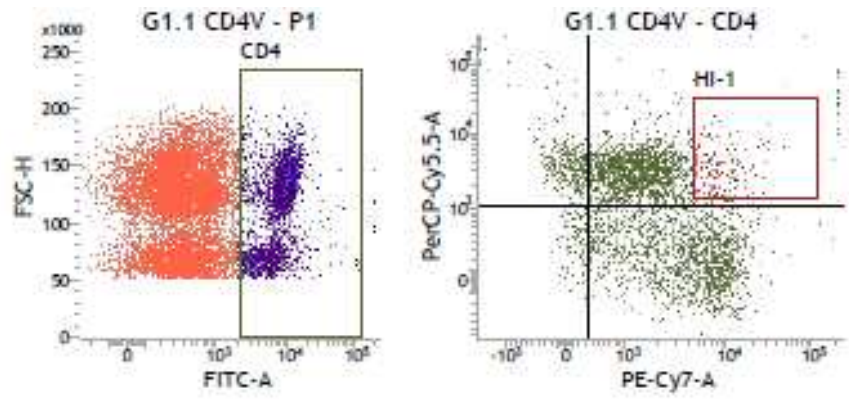


Figura 20: Análise do número de células B nos baços dos animais imunizados. (A), (B) e (C) representam, respectivamente, os gráficos representativos dos grupos imunizados com PBS, DENV3 e com as proteínas. A comparação do número de células B nos três grupos é mostrada em (D).

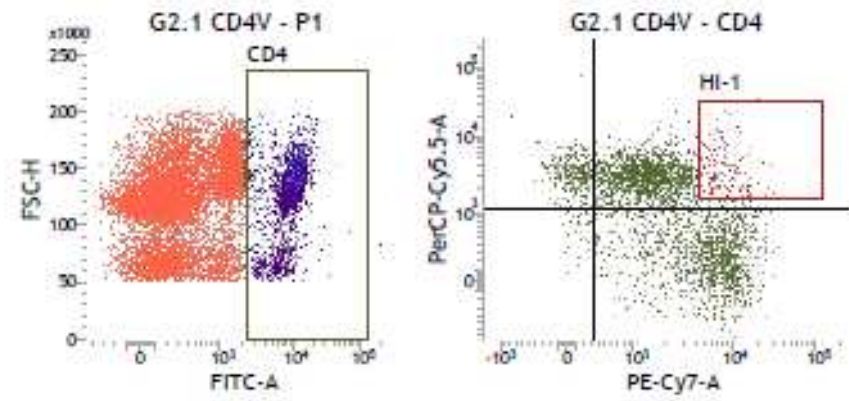
Além da avaliação do número de células B, também foram avaliados a quantidade de células CD4<sup>+</sup>, de células CD4 ativadas (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) e de

células CD4 de memória ( $CD4^+CD44^+CD62L^+$ ), conforme mostrado na figura 21. As mesmas marcações foram realizadas para a identificação das populações de células  $CD8^+$  (Figura 22). Os dados obtidos mostram que houve uma maior produção de células CD4 ativadas no grupo de animais imunizados com as proteínas recombinantes do que nos demais grupos. O mesmo foi observado para células CD4 de memória central ( $CD44^{hi}CD62L^{hi}$ ).

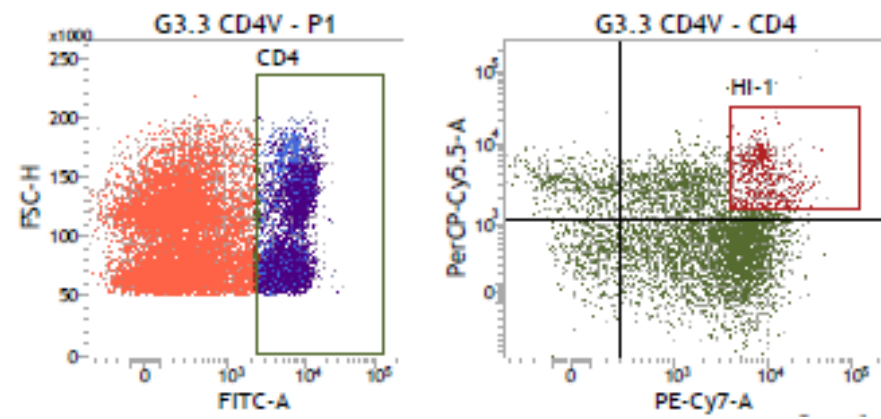
(A)



(B)



(C)



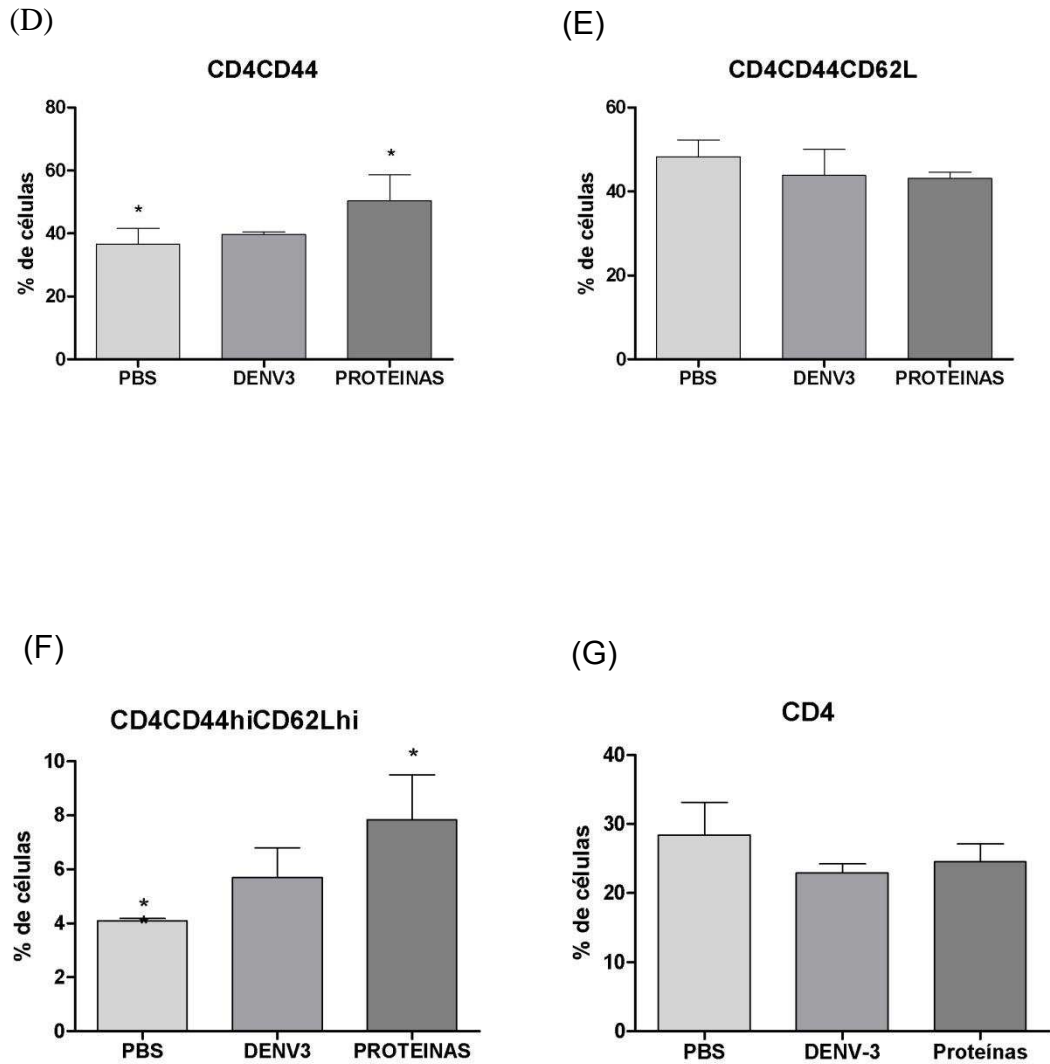
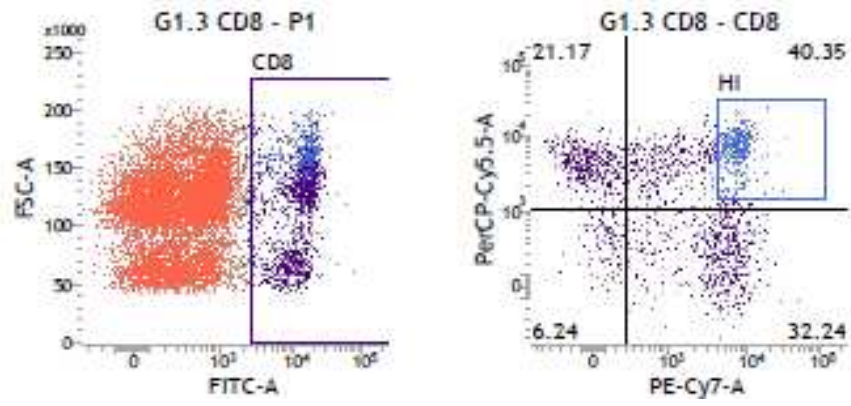


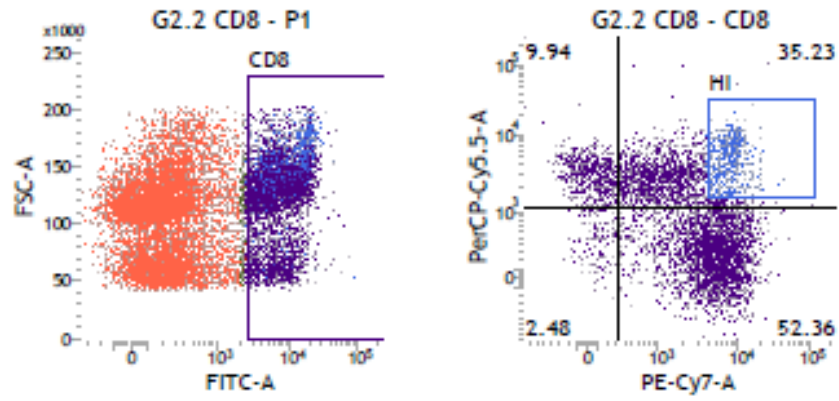
Figura 21: Análise da população de células CD4 presentes nos baços dos animais imunizados. (A), (B) e (C) são gráficos de citometria de fluxo representativos dos grupos cujo imunógeno foi PBS, DENV3 e proteínas, respectivamente. A comparação do número de células CD4<sup>+</sup> ativadas é mostrado em (D), o total de células de memória é mostrado em (E), a análise comparativa de células CD4<sup>+</sup> de memória central é mostrado em (F) e o total de células CD4 é mostrado em (G). \* p<0,05.

Em relação à população de células CD8 nos baços dos animais imunizados, houve uma maior produção de CD8<sup>+</sup> no grupo de animais que receberam o vírus dengue-3 (figura 22 D). Esta população celular também foi encontrada em maior número nos baços dos animais imunizados com as proteínas recombinantes em relação ao grupo que recebeu PBS. Também houve um maior número de células CD8 ativadas (CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) no grupo imunizado com as proteínas, seguido pelo grupo imunizado com o vírus dengue-3 inativado (figura 22E). Porém, a quantidade de células CD8 de memória central foi maior no grupo que recebeu PBS como imunógeno, quando comparado aos demais grupos (figura 22F).

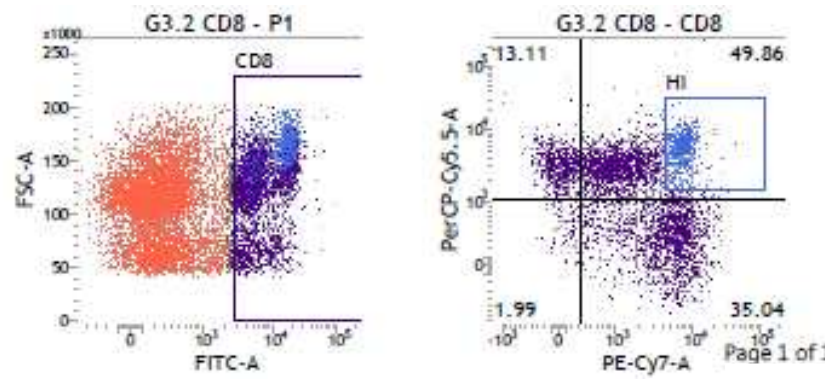
(A)



(B)



(C)



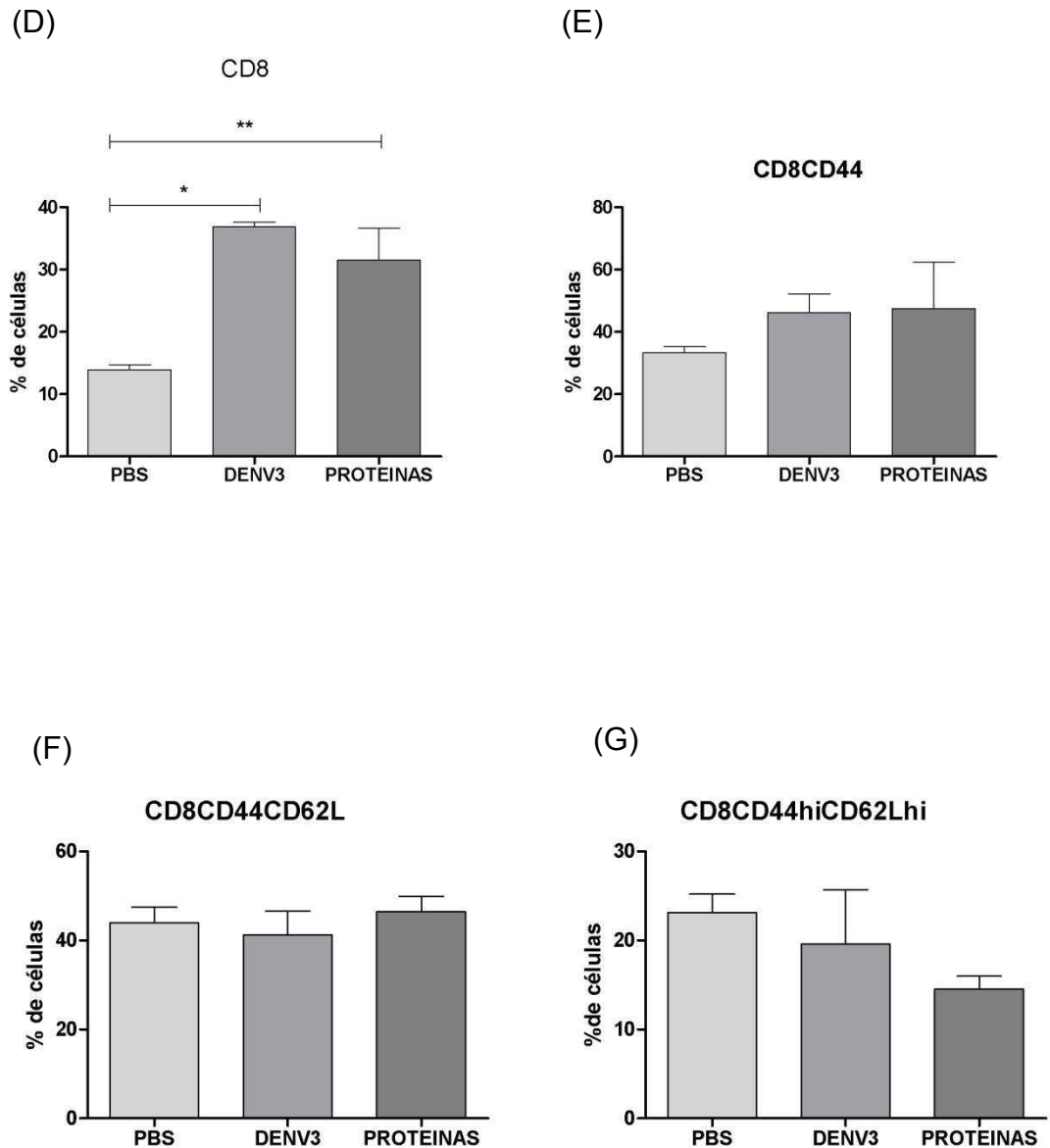


Figura 22: Análise da população de células CD8 presentes nos baços dos animais imunizados. (A), (B) e (C) são gráficos de citometria de fluxo representativos dos grupos cujo imunógeno foi PBS, DENV3 e proteínas, respectivamente. A comparação do número de células CD8<sup>+</sup> é mostrada em (D) e a análise comparativa de células CD8<sup>+</sup> ativadas é mostrada em (E). A quantidade de células CD8 de memória nos diferentes grupos é mostrada em (F) e a porcentagem de células CD8 de memória central é mostrada em (G). \* p<0,05.

### 5.10.2 Linfoproliferação

Para avaliar a resposta das células linfóides de camundongos imunizados *in vitro* frente ao estímulo com o vírus dengue-3, foi realizado um ensaio de linfoproliferação. As células dos grupos que receberam as proteínas recombinantes apresentaram uma discreta proliferação, enquanto as células provenientes dos animais imunizados com o vírus dengue-3 apresentaram proliferação quando estimuladas com 0,5 MOI do vírus (figura 23).

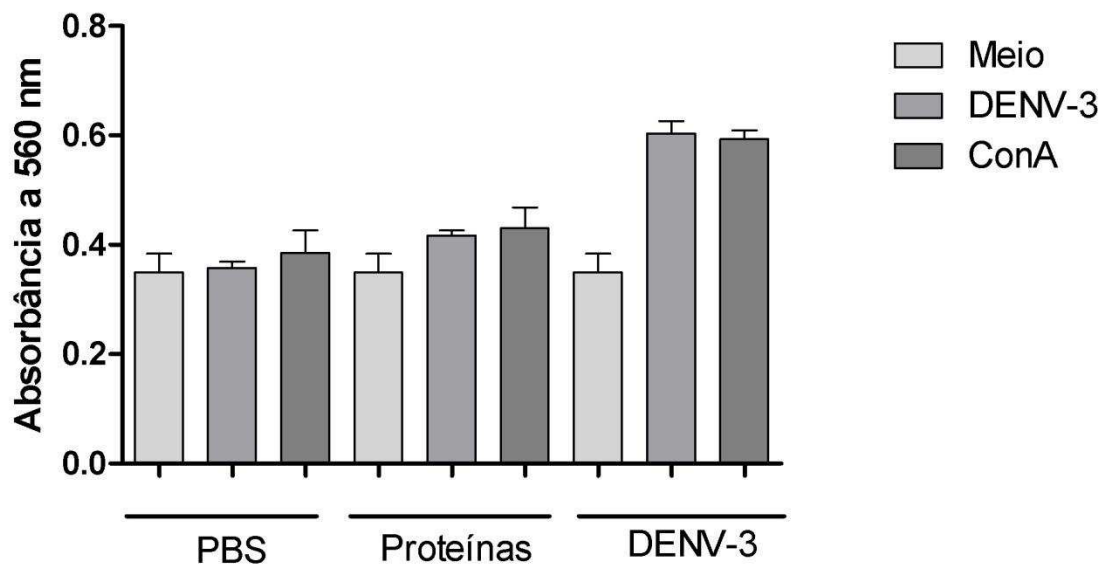


Figura 23: Linfoproliferação dos esplenócitos extraídos dos animais imunizados com PBS, proteínas recombinantes e vírus dengue-3. Como controle negativo, as células foram mantidas em meio RPMI-1640 e como controle positivo as células foram estimuladas com Concanavalina A (ConA).

### 5.10.3 Análise da expressão de citocinas por Real Time PCR

As células extraídas do baço dos animais foram cultivadas durante 6 horas sob estímulo específico com o vírus dengue-3 a fim de mensurar a expressão de RNA mensageiro de IL-4 e IL-10 (padrão Th2 de resposta) e INF- $\gamma$  (padrão de resposta Th1).

Os dados obtidos demonstram que as proteínas recombinantes induziram um padrão de resposta imune Th2 em camundongos, como demonstrado pela maior produção dos RNAs mensageiros das citocinas IL-4 e IL-10, quando comparado com os demais grupos em estudo (figura 24).

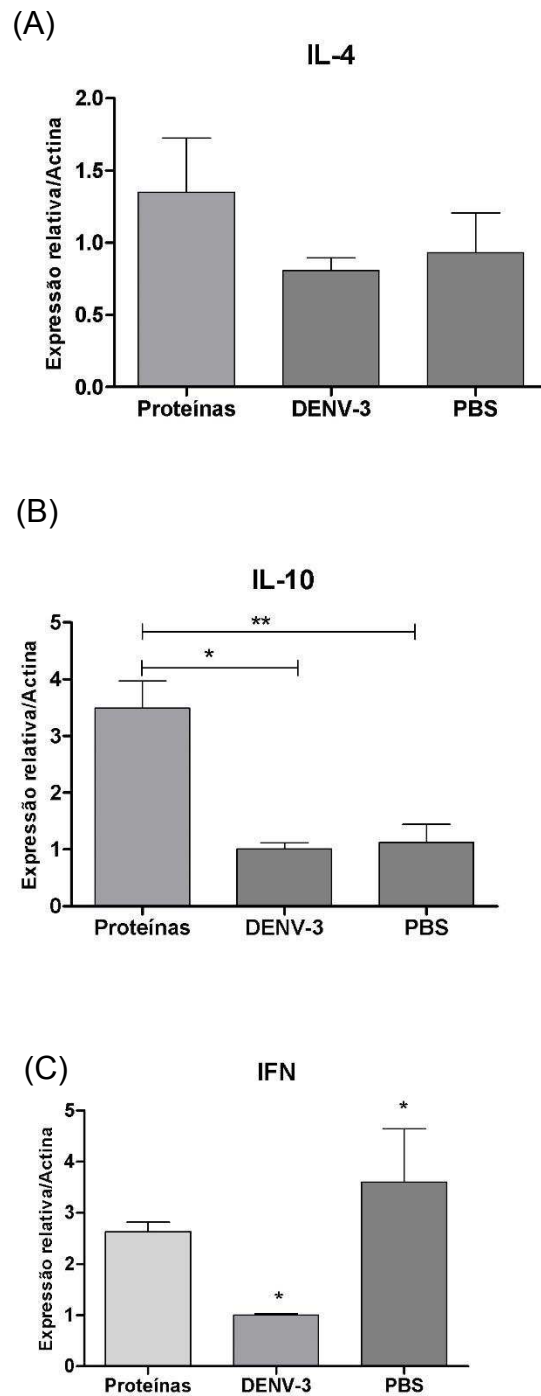


Figura 24: Análise da expressão dos genes das citocinas IL-4 (A), IL-10 (B) e IFN- $\gamma$  (C) após estímulo dos esplenócitos com o vírus dengue-3 em relação ao gene da beta-actina. \*  $p < 0,05$ .

#### 5.10.4 Imunofluorescência indireta

Para verificar se houve a produção de anticorpos específicos contra o vírus dengue-3 e se estes eram capazes de reconhecer a partícula viral, foi realizado um ensaio de imunofluorescência indireta. Como mostra a figura 25,

os anticorpos produzidos nos animais imunizados com as proteínas recombinantes foram específicos contra o vírus dengue-3, sendo capazes de reconhecer os vírus em sua conformação nativa.

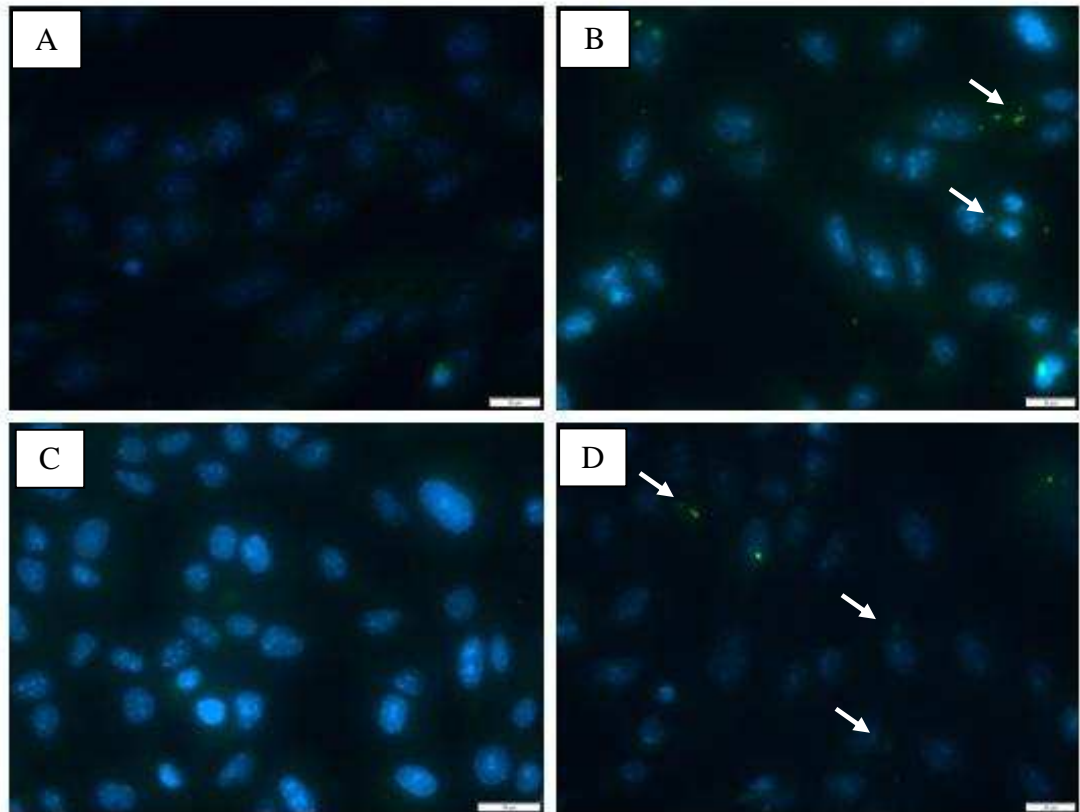


Figura 25: Imunofluorescência indireta dos vírus dengue-3 utilizando-se soros de camundongos imunizados. (A) Células infectadas com o vírus dengue-3 (controle negativo); (B) Detecção utilizando soro de camundongos imunizados com o vírus dengue-3 inativado; (C) Detecção utilizando soro de camundongos imunizados com PBS e (D) Detecção utilizando soro de camundongos imunizados com as proteínas prM e E recombinantes. As setas indicam a detecção das partículas virais pelos soros imunes. Para o contraste nuclear foi utilizado DAPI. A barra de escala corresponde a 20  $\mu$ m.

#### 5.10.5 Análise da produção de anticorpos neutralizantes

Para avaliar se os anticorpos produzidos em resposta à imunização com as proteínas recombinantes eram neutralizantes, os soros dos animais

imunizados foram submetidos à reação de neutralização em placas. A tabela 4 mostra que houve a produção de anticorpos neutralizantes no grupo imunizado com as proteínas 45 dias após a primeira imunização, bem como no grupo imunizado com o vírus dengue-3 inativado.

<b>Imunógeno</b>	<b>Título de Anticorpos Neutralizantes</b>
<b>PBS</b>	0
<b>Dengue-3</b>	256
<b>Proteínas</b>	512

Tabela 4: Título de anticorpos neutralizantes induzidos após imunização com PBS, vírus dengue-3 e proteínas prM e E recombinantes. O título foi determinado como a maior diluição do soro capaz de reduzir em 50% o número de placas de lise em cultura de células infectadas com o vírus dengue-3.

#### **5.10.6 Determinação da Dose Letal<sub>50</sub> e Proteção Pós-Desafio**

Para determinar a dose viral capaz de matar 50% dos animais, grupos de 5 camundongos foram infectados por via intracerebral com diferentes diluições do vírus dengue-3. Os animais foram observados diariamente por 21 dias para registro de mortes, porém durante este período todos os animais sobreviveram. O mesmo aconteceu durante o ensaio de proteção pós-desafio, no qual os animais foram desafiados com  $1 \times 10^4$  PFU do vírus dengue-3 e após 21 dias de observação também não ocorreu nenhuma morte.

## **6. DISCUSSÃO**

O presente trabalho teve como objetivo a expressão das proteínas prM e E do vírus dengue-3 em leveduras *Pichia pastoris* com o intuito de obter antígenos em larga escala e de qualidade para serem utilizados para fins diagnósticos e profiláticos.

O sistema de expressão que nós escolhemos oferece diversas vantagens como o requerimento de técnicas simples para a manipulação molecular, a habilidade de crescer em meios baratos e alcançar altas densidades celulares, a capacidade de produzir proteínas exógenas em grande quantidade e em suas conformações nativas (Macauley-Patrick et al., 2005). Devido à facilidade de cultivo desses micro-organismos, este sistema de expressão é uma boa alternativa para a obtenção de antígenos de qualidade a baixo custo.

Batra e colaboradores expressaram o domínio III da proteína E do vírus dengue-2 em *P. pastoris*. O antígeno obtido foi utilizado para imunizar camundongos Balb/c combinado a dois adjuvantes, alúmen e montanide ISA 720. Ambas as combinações de adjuvantes foram capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, sendo que o grupo que recebeu o domínio III recombinante mais alúmen obteve um título de 205 e no grupo no qual o adjuvante foi o montanide ISA 720 o título foi de 226. Além disso, os autores avaliaram a capacidade do imunógeno em estudo induzir resposta de anticorpos neutralizantes contra os demais sorotipos. Os antissoros exibiram títulos 40 para o vírus dengue-4, mas não foram eficazes contra os sorotipos 2 e 3. Estes resultados mostram a viabilidade do uso de *P. pastoris* para a produção de antígenos dos vírus dengue capazes de induzir potentes respostas de anticorpos neutralizantes (Batra et al., 2010).

A proteína E é o principal antígeno exposto na superfície do virion, sendo o principal alvo de anticorpos. Embora os principais anticorpos neutralizantes contra os vírus dengue em camundongos possuam como alvos o domínio III, estudos têm sido direcionados para avaliar quais os principais epítomos que são alvos de anticorpos neutralizantes em humanos (Valdes et al., 2000; Lazaro-Olan et al., 2008). Anticorpos contra o domínio III estão presentes em baixos níveis no soro imune humano e em um estudo usando

domínio III recombinante para esgotar tais anticorpos de soros humanos foi observada somente uma discreta redução do potencial de neutralização desses soros (Wahala et al., 2009). Assim, nós optamos pela expressão da proteína E em sua totalidade, uma vez que em humanos os anticorpos neutralizantes mais eficazes provavelmente se ligam a epítomos diferentes daqueles presentes no domínio III (Wahala e Silva, 2011).

Além disso, também incluímos o gene da proteína prM em nossa construção com o objetivo de preservar a conformação da proteína E dado que a proteína prM age como uma chaperona, estabilizando a proteína de envelope e assim auxiliando o correto dobramento conformacional de E, além de prevenir uma fusão precoce da mesma durante sua passagem através do aparelho de Golgi (Yu et al., 2009). Após a biossíntese no retículo endoplasmático, as proteínas prM e E formam heterodímeros, os quais são importantes para a montagem de VLPs, o que tem sido visto em trabalhos nos quais a co-expressão destas proteínas foi empregada (Zhang et al., 2011; Tang et al., 2012; Liu et al., 2014 ).

Apesar disso, Mani e colaboradores produziram VLPs do vírus dengue-2 em *P. pastoris* sem a co-expressão de prM e tais partículas mostraram-se imunogênicas em camundongos Balb/c, conferindo proteção de 70% frente ao desafio com o vírus dengue-2 e induziram um título de anticorpos neutralizantes de 1200. Este estudo mostrou que a proteína E possui a característica inerente de formar VLPs sem a presença da proteína prM (Mani et al., 2013).

Neste trabalho, clonamos os genes das proteínas prM e E do vírus dengue-3 no vetor de expressão pPICZαA, o qual codifica seis resíduos de histidina na porção C-terminal da proteína a ser expressa. Porém, a purificação proteica por cromatografia de afinidade em coluna de níquel foi insatisfatória. Ao analisarmos o sobrenadante da cultura de leveduras transformadas com os genes em estudo, após ultracentrifugação em gradiente de sacarose, observamos a presença de VLPs.

Isto pode explicar o baixo rendimento obtido durante a purificação pelo método cromatográfico das proteínas expressas, pois durante o dobramento conformacional para a montagem das partículas a cauda de histidina provavelmente não ficou disponível para a interação com a coluna de afinidade.

Vale lembrar que em outros trabalhos em que VLPs formados foram purificados através de cromatografia em coluna de níquel, o processo de purificação ocorreu mediante condições desnaturantes, como no trabalho supracitado (Mani et al., 2013).

Dada a dificuldade da obtenção dos antígenos, resolvemos realizar a purificação parcial pela precipitação com concentrações crescentes de sulfato de amônio (20% a 80%). Esta técnica foi utilizada por Schagen e colaboradores para a concentração de adenovírus a partir de sobrenadante de cultura celular infectada e mostrou-se satisfatória em comparação com a técnica de precipitação com polietileno-glicol 6000 (PEG-6000). Os vírus foram detectados na fração de 40% de saturação de sulfato de amônio (Schagen et al., 2000). Além disso, Machado e colaboradores empregaram este método para a purificação de biopolímeros “silk-elastin-like” a partir de células bacterianas com êxito (Machado et al., 2013).

Através da análise do perfil protéico das frações obtidas foi observada uma banda de cerca de 50 kDa em todas as frações, correspondente ao peso molecular da proteína E. Isso foi confirmado pelo ensaio de Western Blot utilizando-se um “pool” de soros de pacientes confirmados com dengue.

Porém, bandas de menor peso molecular foram encontradas e reconhecidas por soro hiperimune, que poderiam corresponder à proteína prM, uma vez que a clivagem ineficiente de prM parece ser comum para os vírus dengue, pois as células infectadas com estes vírus secretam uma alta proporção de virions imaturos contendo prM. Além disso, anticorpos contra esta proteína também são encontrados em soros humanos imunes (Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

No entanto, a antigenicidade das proteínas produzidas foi preservada, como confirmado por meio de um estudo retrospectivo utilizando o teste de ELISA indireto. A fração proveniente da precipitação com 60-80% de saturação com sulfato de amônio forneceu uma sensibilidade de 82,61% e especificidade de 89,25% para a determinação da presença de anticorpos anti-IgM em soros de pacientes. Estes valores obtidos estão de acordo com a sensibilidade de diferentes kits diagnósticos comerciais, conforme descrito em um estudo comparativo no qual foram analisados a eficiência de testes comercialmente disponíveis para a determinação de anticorpos IgM em soros de pacientes, os

quais obtiveram um espectro de 85% a 89% para sensibilidade e 88% a 100% de especificidade (Blacksell et al., 2012). Assim, os antígenos aqui produzidos são promissores para uso em testes diagnósticos da dengue.

Apesar da fração oriunda da precipitação com 20% de saturação de sulfato de amônio também possuir a proteína E do vírus dengue-3 recombinante, conforme mostrado no ensaio de Western Blot, esta se mostrou menos eficaz como antígeno durante o ensaio de ELISA, com sensibilidade de 73,91% e especificidade de 82,61%. Uma razão que pode ser apontada para este resultado é que talvez a fração de 60-80% contenha epítomos mais imunogênicos do vírus, e assim forneceu maior poder de discriminação entre as amostras durante o teste realizado.

Rocha e colaboradores utilizaram uma mistura de proteínas E dos quatro sorotipos produzidas em *E. coli* como antígenos em um ensaio de IgG-ELISA. Os resultados obtidos foram 91% de sensibilidade e 98% de especificidade (Rocha et al., 2013). Neste trabalho, em contrapartida, os resultados para o IgG-ELISA foram 76,09% de sensibilidade com especificidade de 84,78%. Porém deve ser levado em conta o fato de que os vírus da dengue possuem epítomos que estão presentes também em outro Flavivirus podendo desencadear reações cruzadas, as quais ocorrem mais frequentemente em relação a anticorpos IgG do que IgM (Koraka et al., 2002; Cuzzubbo et al., 1999).

Além disso, geralmente os ensaios de IgG-ELISA possuem reduzida sensibilidade entre os Flavivirus (Guzman et al., 2010). Vale lembrar que os soros utilizados neste estudo são provenientes de pacientes que vivem na região norte do Brasil, onde além da dengue ocorrem outras epidemias causadas por diferentes Flavivirus. Além disso, outros fatores podem afetar a eficácia de testes sorológicos, como o sorotipo infectante e se a infecção é primária ou não (Fry et al., 2011).

Isto pode afetar o poder de detecção do teste, pois utilizamos antígenos do vírus dengue-3 e os soros utilizados neste estudo podem conter anticorpos que foram induzidos por um sorotipo heterólogo. Dado que não possuíamos informações sobre o período em que as amostras foram coletadas e nem se tratavam de infecções primárias ou não, soma-se o fato de os níveis de

anticorpos IgM e IgG durante uma infecção pelos vírus dengue serem distintos em infecções primárias ou secundárias, o que também pode ter contribuído para os valores de sensibilidade observados.

Os antígenos produzidos neste trabalho também foram testados quanto à capacidade de gerar respostas imunes. Para isso, foi utilizada uma mistura das frações provenientes das precipitações com 20% e 60-80% de sulfato de amônio juntamente com adjuvante de Freund. Como controles, camundongos foram imunizados com PBS e com o vírus dengue-3 inativado.

A análise fenotípica das células extraídas dos baços dos animais imunizados mostrou que não houve aumento significativo no número de células CD4<sup>+</sup>, quando os mesmos foram imunizados com as proteínas prM e E recombinantes ou com o vírus dengue-3. Porém, houve um aumento significativo no número de células CD4 ativadas, ou seja, CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, no grupo que recebeu as proteínas recombinantes em comparação aos demais grupos. Além disso, também foi observado neste grupo um aumento significativo de células CD4 de memória central.

Isto pode ser importante no contexto da infecção pelos vírus dengue, dado que células TCD4<sup>+</sup> podem estar diretamente envolvidas na proteção contra a doença, desde que subclasses deste tipo celular que possuem a capacidade de lisar células infectadas têm sido caracterizadas em doenças causadas por flavivirus, incluindo a dengue (Aihara et al., 1998; Gagnon et al., 1999).

A porcentagem de células CD8 foi maior nos grupos imunizados com as proteínas prM e E recombinantes, bem como no grupo que recebeu o vírus dengue-3, do que no grupo cujo imunógeno foi o PBS. No entanto, entre as células TCD8 ativadas e também entre as células TCD8 de memória, o maior número foi verificado nos animais que receberam PBS. Desta forma, podemos inferir que as proteínas recombinantes produzidas neste trabalho foram capazes de gerar, nos camundongos imunizados, uma resposta de células TCD4, no que diz respeito às subpopulações de células ativadas e de memória.

Estes dados estão de acordo com alguns estudos que mostram que em uma infecção pelos vírus dengue as células T são direcionadas principalmente

para as proteínas não estruturais NS5 e NS3 (Appanna et al., 2007; Weiskopf et al., 2013). Entre estas duas proteínas, NS3 têm se mostrado ser mais imunogênica em relação à resposta imune celular. Porém, recentemente foi mostrado que células TCD4 reconhecem predominantemente epítomos localizados nas proteínas NS1, E e C (Rivino et al., 2013).

Além disso, foi avaliada a capacidade de proliferação dos linfócitos quando estimulados durante 44 horas com o vírus dengue-3. Podemos notar que houve somente uma discreta proliferação dos linfócitos provenientes dos camundongos imunizados com as proteínas prM e E recombinantes.

Os esplenócitos também foram estimulados em placas de 24 poços durante 6 horas. Após isso, os RNAs foram extraídos e submetidos à reação de transcrição reversa para quantificação dos RNAs mensageiros das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 através de PCR em tempo real, para a determinação do padrão de resposta imune induzido frente ao vírus. Pela análise dos resultados obtidos, podemos notar que as proteínas recombinantes induziram um padrão de resposta Th2 nos animais imunizados, verificado pela aumentada expressão dos genes de IL-4 e IL-10, quando comparado aos demais grupos. Apesar de se tratar de uma infecção por um patógeno intracelular, a existência de anticorpos específicos induzidos por vacinação prévia também seria interessante, prevenindo as altas cargas virais observadas em casos mais severos da dengue.

Para avaliar se os anticorpos induzidos pelas proteínas recombinantes eram específicos contra o vírus dengue-3 em sua conformação nativa, foi realizado um ensaio de imunofluorescência indireta utilizando-se como anticorpos primários os soros dos animais dos três grupos em estudo. As proteínas foram capazes de induzir resposta específica de anticorpos em camundongos e estes foram capazes de reconhecer a estrutura viral. Isto também foi verdade para o grupo imunizado com o vírus dengue-3 inativado e não ocorreu no grupo que recebeu PBS acrescido de adjuvate.

A partir disso, os soros foram submetidos a uma reação de PRNT para analisar se tais anticorpos produzidos nos camundongos possuíam a capacidade de reduzir 50% da infectividade das partículas virais em células

Vero. Verificamos que as proteínas recombinantes induziram um título de anticorpos neutralizantes de 520 nos camundongos avaliados, enquanto que no grupo imunizado com o vírus dengue-3 houve um título de 256 de anticorpos neutralizantes nos soros imunes. Dessa forma, podemos notar que as proteínas produzidas neste estudo possuem a capacidade de induzir fortes respostas de anticorpos neutralizantes.

Dessa forma, o candidato vacinal em estudo não foi eficiente em induzir potentes respostas de células T citotóxicas, o que ficou evidenciado pela fraca proliferação celular e pelo padrão de citocinas produzidas frente ao estímulo. Isto está de acordo com a resposta desencadeada por outras vacinas de subunidades e vacinas de vírus inativados, as quais induzem respostas específicas de anticorpos neutralizantes (Rothman, 2011), o que também ficou demonstrado em nosso estudo.

Liu e colaboradores expressaram as proteínas prM e E do vírus dengue-2 em leveduras *P. pastoris* e verificaram que as mesmas foram produzidas sob a forma de VLPs. Estes autores utilizaram os VLPs purificados para imunizar camundongos Balb/c e verificaram a indução de anticorpos neutralizantes em um título de 45. Em contrapartida, a abordagem empregada neste trabalho mostrou-se mais eficiente na indução de resposta imune humoral, conforme verificado pelo alto título de anticorpos neutralizantes obtidos (Liu et al., 2010).

Em outro estudo, a imunização de camundongos com VLPs purificados produzidos somente a partir da expressão da proteína E acrescida dos 34 resíduos de aminoácidos da região C-terminal de prM, foi capaz de induzir uma potente resposta de anticorpos neutralizantes, alcançando o título de 1200, além de serem estáveis a 37 °C por duas semanas (Mani et al., 2013). Dessa forma, os VLPs aqui produzidos devem ser analisados em sua forma íntegra através do emprego de outras técnicas de purificação, para avaliarmos qual a melhor estratégia a ser empregada.

Um dos grandes desafios ao desenvolvimento de uma vacina eficiente é a falta do completo entendimento das complexas interações entre os vírus dengue e o sistema imune do hospedeiro. Isto é, em grande parte, devido à falta de modelos animais adequados para estudos sobre a infecção viral. Estes

estudos têm sido dificultados devido ao baixo nível de replicação de isolados clínicos dos vírus dengue em camundongos selvagens e à falta de doença clínica em primatas não humanos (Zompi and Harris, 2012). Tradicionalmente a inoculação intracerebral de altas doses de cepas dos vírus dengue neurovirulentas é utilizada em camundongos recém-nascidos e também em camundongos adultos imunocompetentes, o que induz doença neurológica e paralisia (Raut et al., 1996). As manifestações neurológicas raramente são observadas em humanos, sendo consideradas como apresentações clínicas atípicas (Whitehead et al., 2007).

Camundongos imunocompetentes, tais como A/J, Balb/c e C57BL/6, suportam algum nível de replicação dos vírus dengue. As espécies A/J e Balb/c geralmente sucumbem para paralisia. Já os camundongos C57BL/6 exibem manifestações hemorrágicas quando infectados com uma alta dose dos vírus através da rota intradérmica (Chen et al., 2007). Em um estudo recente, Gonçalves e colaboradores utilizaram uma menor concentração viral ( $2 \times 10^7$  PFU/mL) do vírus dengue-1 inoculados via intraperitoneal em camundongos C57BL/6. Foram observadas altas concentrações de aminotransferases, infiltrações hepáticas inflamatórias, trombocitopenia, manifestações hemorrágicas nos baços e aumento da produção de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ . Além disso, foi observada viremia com detecção do vírus no fígado, cérebro e rim dos animais infectados (Gonçalves et al., 2012).

Apesar disso, nós optamos em avaliar as proteínas prM e E recombinantes quanto à capacidade de conferir proteção em camundongos contra o vírus dengue-3 em camundongos C57BL/6, porém sem êxito. Em um primeiro momento foi realizado um ensaio para a determinação da dose viral capaz de provocar a morte de 50% dos animais (DL50). Grupos de cinco animais foram infectados por via intracerebral com diluições diversas diluições da solução viral, a qual possuía um título de  $2 \times 10^6$  PFU/mL. Porém, não houve morte dos animais infectados.

Optamos por realizar, mesmo assim, o ensaio de proteção pós-desafio. Os animais foram imunizados 3 vezes por via intraperitoneal com as proteínas recombinantes, o vírus dengue-3 inativado ou PBS, todos com adjuvante de Freund. Após 15 dias da última imunização, cada animal foi desafiado com  $10^4$

unidades formadoras de placa através da via intracerebral e observados por 21 dias para registro de sobrevivência. Mais uma vez não foram observadas mortes em nenhum dos grupos. Isto indica a reduzida neurovirulência em camundongos do vírus que possuímos em nosso laboratório.

Cepas dos vírus dengue com alta neurovirulência em camundongo são conseguidas através de passagens consecutivas em cérebros de camundongos neonatos (Cole e Wisseman, 1969). Assim são necessárias mais passagens do mesmo em cérebro desses animais para aumentar a neurovirulência em camundongos do nosso estoque viral. Assim, após realizarmos tal procedimento, os ensaios da determinação da dose letal e também a avaliação da proteção pós-desafio conferida pelos imunógenos aqui produzidos deverão ser repetidos.

Baseado nos resultados encontrados até aqui, podemos concluir que apesar das proteínas recombinantes em estudo serem fortes indutores de anticorpos neutralizantes, são necessários mais estudos sobre seu potencial como imunógeno contra a dengue, como avaliação de outros adjuvantes ou mesmo de outros esquemas de imunização, além da análise de formulações tetravalentes, na busca por um candidato que confira proteção contra este mal que acomete grande parte da população mundial.

Porém, é importante ressaltar que a metodologia proposta é de grande valia, uma vez que a obtenção dos antígenos utilizados não requer métodos de purificação proteica caros e laboriosos. Assim, as proteínas estruturais dos demais sorotipos dos vírus da dengue poderiam ser produzidas utilizando-se a mesma estratégia empregada aqui, visando à criação de testes diagnósticos de baixo custo e em larga escala, o que torna a produção desses antígenos acessíveis às regiões onde a dengue é endêmica.

## **7. CONCLUSÕES**

A partir dos resultados obtidos durante o presente estudo, podemos concluir que:

- Os genes otimizados para expressão em leveduras das proteínas prM e E do vírus dengue-3 foram satisfatoriamente clonados em *P. pastoris*;
- As proteínas recombinantes foram produzidas em sua correta conformação de forma solúvel no sobrenadante da cultura de leveduras;
- As proteínas prM e E recombinantes foram expressas sob a forma de ‘virus-like particles’ (VLPs);
- As proteínas foram bons antígenos em testes de ELISA, conforme demonstrado em um estudo retrospectivo utilizando-se soros de pacientes;
- Os antígenos recombinantes foram capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus dengue-3 em camundongos, o que os caracteriza como promissores na busca pela vacina contra a dengue.

## **8. PERSPECTIVAS**

As próximas etapas deste trabalho serão a utilização dos antígenos aqui obtidos na criação de um teste diagnóstico rápido da dengue baseado na técnica de imunocromatografia. Além disso, as proteínas devem ser avaliadas quanto à capacidade de proteção em camundongos frente ao desafio com o vírus dengue-3. Os VLPs produzidos também devem ser purificados através de ultrafiltração e utilizados como antígenos em testes de ELISA para avaliar seu potencial em testes diagnósticos contra a dengue, bem como ser avaliados como imunógenos em camundongos para a determinação da melhor estratégia de obtenção dos antígenos a ser empregada.

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AIHARA H., TAKASAKI T., MATSUTANI T., SUZUKI R., KURANE I. Establishment and characterization of Japanese encephalitis virus-specific human CD4 T-cell clones: flavivirus crossreactivity, protein recognition, and cytotoxic activity. *J. Virol.*, 72:8032. 1998.

ALLISON S.L., STIASNY K., STADLER K., MANDL C.W., HEINZ F.X. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. *J Virol* ,73:5605–5612. 1999.

APPANNA R., HUAT T.L., SEE L.L., TAN P.L., VADIVELU J., DEVI S. Cross-reactive T-cell responses to the nonstructural regions of dengue viruses among dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Malaysia. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(8):969–77. 2007.

AZEVEDO A. S., GONÇALVES A. J. S., ARCHER M., FREIRE M. S., GALLER R., ALVES A. M. B. The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. *PlosOne*, 8(3). 2013.

BATRA G., RAUT R., DAHIYA S., KAMRAN N., SWAMINATHAN S., KHANA N., et al. *Pichia pastoris*-expressed dengue virus type 2 envelope domain III elicits virus-neutralizing antibodies. *Journal of Virological Methods*, 167: 10-16. 2010.

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

BLACKSELL S. D., JARMAN R. G., GIBBONS R. V., TANGANUCHITCHARNCHAI A., MAMMEN M. P., NISALAK A., et al. Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked

immunosorbent assays for detection of acute dengue infection. *Clin. Vaccine Immunol.*, 19(5): 804-810. 2012.

BURKE D.S., MONATH T.P. Flavivirus. In: Knipe, D. M., Howley, P. M., editors. *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Williams & Willkins; 2001. pp. 1043–1125.

CARDOSO S. A., PAIXÃO V. F., OLIVEIRA M.D., HONDA E. R., OLIVEIRA L.L., DA SILVA C. C., DE PAULA S. O. Dengue-1 envelope protein domain III produced in *Pichia pastoris*: potential use for serological diagnosis. *Protein Expr Purif*, 92(1): 9-13. 2013.

CEREGHINO J. L., CREGG J. M. Heterologous protein expression in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 24(1): 45-66. 2000.

CHATURVERDI U. C., SHRIVASTANA R., NAGAR R. Dengue vaccines: Problems & prospects. *Indian J Med Res*, 121: 639-52. 2005.

CHEN Y., MAQUIRE T., HILEMAN R. E., FROMM J. R., ESKO J. D., LINHARDT R. J., MARKS R.M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparin sulfate. *Nat Med*, 3(8): 866-871. 1997.

CHEN H.C., HOFMAN F.M., KUNG J.T., LIN Y.D., WU-HSIEH B. A. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol*, 81:5518–26. 2007.

CLEMENTS D. E., COLLIER B. A., LIEBERMAN M. M., OGATA S., WANG G., HARADA K. E., et al. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine*, 28(15): 2705-2715. 2010.

COLE G. A., WISSEMAN C.L. Pathogenesis of type 1 dengue virus infection in suckling, weanling and adult mice: the relation of virus replication to interferon and antibody formation. *Am. J. Epidemiol.*, 89: 669-680. 1969.

COLLER B. A., CLEMENTS D.E. Dengue vaccines: progress and challenges. *Curr Opin Immunol.*, 23: 391-398. 2011.

COURDEC R., BARATTI J. Oxidation of methanol by yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44: 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.

CUZZUBBO A.J., VAUGHN D.W., NISALAK A., SOLOMON T., KALAYANAROOJ S., AASKOV J., et al. Comparison of PanBio dengue duo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and MRL dengue fever virus immunoglobulin M capture ELISA for diagnosis of dengue virus infections in Southeast Asia. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6: 705–712. 1999.

DALY H., HEARN M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 18(2): 119-138. 2005.

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.

DURBIN A. P., WHITEHEAD S. S. Next-generation dengue vaccines: novel strategies currently under development. *Viruses*, 3: 1800-1814. 2011.

DUTRA N. R., DE PAULA, M. B., OLIVEIRA, M. D., OLIVEIRA L. L., DE PAULA S. O. The laboratorial diagnosis of dengue: applications and implications. *Journal of Global Infectious Diseases*, 1: 38-44. 2009.

FISCHL W., BARTENSCHLAGER . Exploitation of cellular pathways by dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 470-475. 2011.

FRY S. R., MEYER M., SEMPLE M. G., SIMMONS C. P., SEKARAN S. D., HUANG J. X., et al. The diagnostic sensivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5: 1-8. 2011.

GAGNON S. J., ENNIS F. A., ROTHMAN A. L. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4+ cytotoxic T-lymphocytes clones. *J. Virol.*, 73:3623. 1999.

GRGACIC E. V., ANDERSON D. A. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*, 40: 60-65. 2006.

GONÇALVES D., PRADO R. Q., XAVIE E. A., OLIVEIRA N. C., GUEDES P. M. M., SILVA J. S., et al. Immunocompetent mice model for dengue vírus infection. *The scientific World Journal*, 2012.

GUBLER, DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* ,10:100–103. 2002.

GUBLER DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:480–96. 1998.

GUZMAN M. G., HALSTEAD S. B., ARTSOB H., BUCHY P., FARRAR J., GUBLER D. J., et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*, 8: S7-S16. 2010.

GUY B., SAVILLE M., LANG J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Hum. Vaccin*, 6(9). 2010.

HALSTEAD, S. B., O'ROURKE E.J. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature*, **265**:739–741. 1977.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, **239**: 476–481.1988.

HEINZ F. X., ALLISON S. L. Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv. Virus Res.* 59:63–97. 2003.

HOLMES D. A., PURDY D. E., CHAO D. Y., NOGA A. J., CHANG G. J. Comparative analysis of immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect IgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 3227-3236. 2005.

HOMBACH J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, 21(4): 254-260. 2007.

ISHIKAWA T., YAMANAKA A., KONISHI E. A review of successful flavivirus vaccines and problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine*, 32: 1326-1337. 2014.

JESSIE K., FONG M.Y., DEVI S., LAM S.K., WONG K.T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*, 189:1411–1418. 2004.

JUNJHON J., EDWARDS T. J., UTAIPAT U., BOWMAN V. D., HOLDAWAY H. A., ZHANG W., KEELAPANG P., et al. Influence of pr-M Cleavage on the Heterogeneity of Extracellular Dengue Virus Particles. *Journal of Virology*, 84 (16): 8353-8358. 2010.

KALAYANAROOJ, S. *et al.* Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J. Infect. Dis.*, **176**: 313–321. 1997.

KORAKA P., ZELLER H., NIEDRIG M., OSTERHAUS A.D., GROEN J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes and Infection*, 4:1209–1215. 2002.

KRAINER F. W., DIETZSCH C., HAJEK T., HERWIG C., SPADIUT O., GLIEDER A. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains and engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories*, 11:22. 2012.

KUHN, R. J., ZHANG, W., ROSSMANN, M. G., PLETNEV, S. V., CORVER, J., LENCHES, E., *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5): 717-25. 2002.

KYLE J.L., HARRIS E. Global spread and persistence of dengue. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62:71–92. 2008.

LAZARO-OLAN L., MELLADO-SANCHEZ G., GARCIA-CORDERO J., ESCOBAR-GUTIERREZ A., SANTOS- ARGUMEDO L., GUTIERREZ-CASTANEDA B., CEDILLO-BARRON L. Analysis of antibody response in human dengue patients from the Mexican coast using recombinant antigens. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 8: 69–79. 2008.

LI L, LOK S.M., YU I.M., ZHANG Y., KUHN R., CHEN J., ROSSMANN M. G. Structure of the flavivirus precursor membrane-envelope protein complex and its implication for maturation. *Science*, 319:1830-1834. 2008.

LIU W., JIANG H., ZHOU J., YANG X., TANG Y., FANG D., JIANG L. Recombinant dengue virus-like particles from *Pichia pastoris*: efficient production and immunological properties. *Virus Genes*, 40: 53-59. 2010.

LIU Y., ZHOU J., YU Z., FANG D., FU C., ZHU X., HE Z., et al. Immunological properties reveal the monovalent and bivalent recombinant dengue virus-like particles as candidate for vaccine. *Microbiol Immunol*, 15. 2014.

LUDWIG C., WAGNER R. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr Opin Biotechnol*, 18(6): 537-545. 2007.

MACAULEY-PATRICK S., FAZENDA M.L., MCNEIL B., HARVEY L.M. Heterologous protein production using *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249–270. 2005.

MACHADO R., AZEVEDO-SILVA J., CORREIA C., COLLINS T., ARIAS F. J., RODRIGUEZ-CABELLO J. C., CASAL M. High level expression and facile purification of recombinant sil-elastin-like polymers in auto induction shake flask cultures. *AMB Express*, 3:11. 2013.

MANI S., TRIPATHI L., RAUT R., TYAGI P., ARORA U., BARMAN R. S., GALAV A., et al. *Pichia pastoris*-expressed dengue-2 envelope forms virus-like particles without pre-membrane protein and induces high titer neutralizing antibodies. *PlosOne*, 8(5).

MARTINA B. E. E., KORAKA P., OSTERHAUS A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: a integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*, 22: 564-581. 2009.

MEERTENS L., CARNEC X., LECOIN M. P., RAMDASI R., GUIVEL-BENHASSINE F., LEW E., et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe*, 12(4): 544–557. 2012.

MILLER J. L., deWET B. J. M., MARTINEZ-POMARES L., RADCLIFFE C. M., DWEK R. A., RUDD P. M., GORDON S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PlosPathogens*, 4: 1-11. 2008.

MODIS, Y., OGATA S., CLEMENTS D., HARRISON S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427:313–319. 2004.

MORRISON D., LEGG T. J., BILLINGS C. W., FORRAT R., YOKSAN S., LANG J. A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naïve adults. *J Infect Dis*, 201: 370-377. 2010.

MURPHY, B.R., WHITEHEAD S.S. Immune response to dengue virus and prospect for a vaccine. *Annu. Rev. Immunol.*, 29:587-619. 2011.

NAVARRO-SANCHEZ E., ALTMAYER R., AMARA A., SCHWARTZ O., FIESCHI F., VIRELIZIER J., et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.*, 4(7): 723-728. 2003.

NIELSEN, D. G. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virology Journal*, 6: 211-.217. 2009.

NORMILE, D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*, 342: 415. 2013.

PEELING R. W., ARTSOB J. L.P., BUCHY P., CARDOSA M. J., DEVI S., ENRIA D. A., et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 8: 530-538. 2010.

PERERA R., KUHN R. J. Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 369-77. 2008.

RAUT C.G., DEOLANKAR R.P., KOLHAPURE R.M., GOVERDHAN M.K. Susceptibility of laboratory-bred rodents to the experimental infection with dengue virus type 2. *Acta Virol.*, 40: 143–146. 1996.

REY F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *PNAS*, 100: 6899-6901. 2003.

RIVINO L., KUMARAN E.A., JOVANOVIĆ V., NADUA K., TEO E.W., PANG S.W., et al. Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in denguevirus infection. *Journal of Virology*, 87(5):2693–706. 2013.

RODENHUIS-ZYBERT I. A., WILSCHUT J., SMIT J.M. dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67: 2773-2786. 2010.

RODENHUIS-ZYBERT I. A., VAN DER SCHAAR H. M., VOORHAM J. M., ENDE-METSELAAR H., LEI H. Y., WILSCHUT J., SMIT J. M. Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PlosPathogens*, 6(1). 2010.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, Ann. Arbor., 113: 946-951, 2004.

ROTHMAN A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.*, 11: 532-543. 2011.

SAMBROOK J.,FRITSCH E. F., MANIATS T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> edição. Cold Spring Harbor laboratory press. Plainview, NY, USA. 1989.

SHANG W., LIU J., YANG J., HU Z., RAO X. Dengue virus-like particles: construction and application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94(1): 39-46. 2012.

SABCHAREON A., WALLACE D., SIRIVICHAVAKUL C., LIMKITTIKUL K., CHANTHAVANICH P., SUVANNADABBA S., et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai

schoolchildren: a randomized, controlled phase 2b trial. *Lancet*, 380 (9853): 1559-1567. 2012.

SCHAGEN F. H. E., RADEMAKER H. J., RABELINK M. J. W. E., VAN ORMONDT H., FALLAUX F. J., VAN DER EB A. J., HOEBEN R. C. Ammonium sulphate precipitation of recombinant adenovirus from culture medium: an easy method to increase the total virus yield. *Gene Therapy*, 7:1570-1574. 2000.

TANG Y., JIANG L., ZHOU J., YIN Y., YANG X., LIU W., FANG D. Induction of virus-neutralizing antibodies and T cell response by dengue virus type 1 virus-like particles prepared from *Pichia pastoris*. *Chin Med J.*,125(11): 1986-1992. 2012.

TAPIA-CONYER, R., GALVÁN, J. F. M., RINCÓN, H. G. The growing burden of dengue in Latin America. *Journal of Clinical Virology* , 46: 53-56. 2009.

TASSANEETRITHEP B., BURGESS T. H., GRANELLI- PIPERNO A., TRUMPFHELLER C., FINKE J., SUN W., et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 197: 823–829. 2003.

TSAI W., HSIEH S., LAI C., LIN H., NERURKAR V., WANG W. C-terminal helical domains of dengue virus type 4 E protein affect the expression/stability of prM protein and conformation of prM and E proteins. *PlosOne*, 7: 1-14.

VALDES K., ALVAREZ M., PUPO M., VAZQUEZ S., RODRIGUEZ R., GUZMAN M.G. Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7: 856–857. 2000.

VASILAKIS N, HOLMES EC, FOKAM EB, FAYE O, DIALLO M, et al. Evolutionary processes among sylvatic dengue type 2 viruses. *J. Virol.* 81:9591–95. 2007.

VASILAKIS N, TESH RB, WEAVER SC. Sylvatic dengue virus type 2 activity in humans, Nigeria, 1966. *Emerg. Infect. Dis.* 14:502–4. 2008.

WAHALA W.M., KRAUS A.A., HAYMORE L.B., ACCAVITTI-LOPER M.A., DE SILVA, A.M. Dengue virus neutralization by human immune sera: Role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology*, 392: 103–113. 2009.

WAHALA M. P. B. W., SILVA A. M. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*, 3: 2374-2395. 2011.

WAN S. W., LIN C.F., WANG S., CHEN Y. H., YEH T. M., LIU H. S., ANDERSON R., LIN Y. S. Current progress in dengue vaccines. *Journal of Biomedical Science*, 20:37. 2013.

WEISKOPF D., ANGELO M.A., AZEREDO E.L., SIDNEY J., GREENBAUM J.A., FERNANDO A.N., et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 110(22):E2046–53. 2013.

WHITEHEAD, S. S., BLANEY, J. E., DURBIN, A. P., and MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.*, 5(7): 518-28. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and Severe Dengue. (2014). Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.

WU S.J., GROUARD-VOGEL G., SUN W., MASCOLA J.R., BRACHTEL E., PUTVATANA R., et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med*, 6:816–820. 2000.

YU I.M., HOLDAWAY H.A., CHIPMAN P.R., KUHN R.J., ROSSMANN M.G., et al. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *J Virol*, 83:12101–12107. 2009.

ZHANG W., CHIPMAN P.R., CORVER J., JOHNSON P.R., ZHANG Y., et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat. Struct. Biol.*, 10:907–912. 2003.

ZHANG W., CHIPMAN P.R., CORVER J., JOHNSON P.R., ZHANG Y., et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol*, 10: 907–912. 2003.

ZHANG S., LIANG M., GU W., LI C., MIAO F., WANG X., et al. Vaccination with dengue virus-like particles induces humoral and cellular responses in mice. *Virology Journal*, 8:333. 2011.

ZOMPI S., HARRIS E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses*, 4(1): 62-82. 2012.

ZUST R., DONG H., LI X. F., CHANG D. C., ZHANG B., BALAKRISHNAN T., et al., Rational design of a live attenuated dengue vaccine: 2'-O-methyltransferase mutants are highly attenuated and immunogenic in mice and macaques. *PlosPathogens*, 9(8). 2013.

ZYBERT I. A., ENDE-METSELAAR H., WILSCHUT J., SMITH J. M. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *Journal of General Virology*, 89: 3047-305. 2008.

