UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Clonagem e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do vírus da
dengue tipo 3**

Anibal Silva de Oliveira

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Clonagem e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do vírus da
dengue tipo 3**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia
para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientado: Anibal Silva de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Ribeirão Preto

2013

OLIVEIRA, A. S.	Clonagem e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3		Mestrado FCFRPUSP 2013
-----------------	---	--	------------------------------

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva de Oliveira, Anibal

Clonagem e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3
do vírus da dengue tipo 3. Ribeirão Preto, 2013
46p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

1. Clonagem. 2. Expressão. 3. Proteínas recombinantes. 4.
Dengue.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Anibal Silva de Oliveira

Clonagem e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino
Quintana

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus, em primeiro lugar pelo dom da vida e aos meus pais Alfredo e Vera e irmãos Mateus e Valeria, os quais, são individualmente sinônimo de perseverança e dedicação e juntos formam a razão da minha vida e a força que me move todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

A Deus, por permitir concretizar mais um sonho e por me fazer compreender que tudo é no tempo certo e oportuno.

Aos meus pais Alfredo e Vera, que sempre me incentivaram e ensinaram a lutar por meus objetivos.

Ao meu irmão Mateus e sua esposa Maristela pelo suporte, carinho e conselhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana, por ter aberto as portas do laboratório, pela paciência e confiança depositadas em mim e pelo incentivo para realização deste trabalho sem nunca desistir frente aos obstáculos encontrados.

A minha eterna amiga Vanessa pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis e por tantos cuidados e ensinamentos.

Ao meu amigo Fábio, pela companhia, pela troca de experiências e pela vida social.

As minhas irmãs de laboratório Adriana e Raquel que com paciência e dedicação alegraram meus dias dentro e fora do laboratório e pela contribuição para transformar o ambiente de trabalho agradável e divertido.

Aos meus queridos colegas de laboratório, antigos e novos, Helda, Telma, Rafael Q., Denise, Natalia, Larissa, Nilton, Nicole, Sabrina, Gabriela, Rafael L., Jaseem, Veridiana, pela companhia, paciência e colaboração no ambiente de trabalho.

Ao amigo Alberto, o qual em diversos momentos contribuiu para a realização deste trabalho, me servindo com seu conhecimento principalmente nos momentos em que um obstáculo técnico era encontrado.

Ao meu amigo/irmão Guilherme o qual esteve sempre presente com conselhos e disposição para ajudar.

Aos meus amigos de república, novos e antigos, Caleo, Pedro, Gabriel, Emerson e Maicon, pelas conversas noturnas cheias de conselhos e pela amizade que tornavam divertidos meus dias fora do laboratório.

À Aline, Amanda e Lelis pelo suporte técnico, tornando sempre mais fácil meu trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo suporte administrativo.

Aos docentes, colegas e funcionários do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP e da FCFRP.

Às agências de fomento CNPq pela bolsa de estudo concedida, e FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Muito obrigado a todos.

Anibal

"Se você já construiu castelos no ar, não tenha vergonha deles.
Estão onde devem estar. Agora, dê-lhes alicerces."
Henry David Thoreau

Resumo

Oliveira, A. S. **Clonagem e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3**. 2013. 46f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A dengue é uma doença infecciosa com grandes taxas de morbimortalidade, causada pelo vírus da dengue (DENV). Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas anualmente em mais de 100 países tropicais e subtropicais de todos os continentes. O espectro clínico da infecção pelo DENV pode incluir formas assintomáticas ou sintomáticas que variam desde uma febre indeterminada e autolimitada, passando pela febre clássica da dengue (FD) até quadros graves denominados febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD). Recentemente, ocorreu um dramático aumento do número de casos de FHD/SCD nas Américas, e este aumento coincidiu com a introdução do dengue sorotipo 3, genótipo III. No presente trabalho, objetivou-se a clonagem e a expressão das proteínas NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3. As proteínas NS1 e NS3 do DENV-3 foram clonadas e expressas com sucesso em sistema procarioto. A amplificação dos genes das proteínas NS1 e NS3 foi realizada por RT-PCR, o qual gerou *amplicons* de cerca de 1050 e 1850 pb, respectivamente. Em seguida, os genes foram clonados por inserção dos *amplicons* no vetor plasmidial pCR-XL. Os genes de NS1 e NS3 foram subclonados no vetor de expressão pQE-30 através de sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *HindIII*. A expressão proteica foi obtida em sistema procarioto utilizando a cepa BL21(DE3) de *E. coli*, resultando em proteínas de 45 e 70 kDa as quais foram confirmadas por análises em *Western blot* utilizando como anticorpo primário fluido ascítico imune de camundongos e soro de pacientes com dengue. Estas proteínas virais podem ser utilizadas para estudos relacionados à patogênese, replicação e mecanismos de escape do sistema imune do DENV, além disso, podem ser potenciais antígenos em métodos de diagnóstico.

Palavras chave: Vírus da dengue, clonagem, expressão, proteínas recombinantes, NS1, NS3.

ABSTRACT

Oliveira, A. S. **Cloning and expression of recombinant NS1 and NS3 proteins of dengue virus type 3**. 2013. 46f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Dengue is an infectious disease with high morbidity and mortality rates caused by dengue virus (DENV). According to the World Health Organization, about 50 to 100 million people are infected annually in more than 100 tropical and subtropical countries from all continents. The clinical spectrum of DENV infection can include asymptomatic or symptomatic forms ranging from undetermined and self-limited fever, through dengue fever (DF) to severe disease called dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). Recently, there has been a dramatic increase in the number of cases of DHF/DSS in the Americas, and this increase coincided with the introduction of dengue virus type 3 (DENV-3), genotype III. The present study aimed to clone and express NS1 and NS3 proteins of DENV-3. The NS1 and NS3 proteins of DENV-3 were successfully cloned and expressed in a prokaryotic system. Amplification of NS1 and NS3 genes was carried out by RT-PCR, which yielded amplicons of approximately 1050 and 1850 bp, respectively. Then, the genes were cloned by inserting the amplicons into the plasmid vector pCR-XL. NS1 and NS3 genes were subcloned into the expression vector pQE-30 through the restriction sites for *Bam*HI and *Hind*III enzymes. The protein expression was obtained in a prokaryotic system using the strain BL21 (DE3) of *E. coli*, resulting in 45 and 70 kDa proteins, which were confirmed by Western blot analysis using immune mouse ascitic fluid and serum of patients with dengue as primary antibody. These viral proteins can be used to study the pathogenesis, mechanisms of replication and immune escape of DENV, moreover, can be potential antigens in diagnostic methods.

Keywords: Dengue Virus, Cloning, expression, recombinant proteins, NS1, NS3.

RESUMEN

Oliveira, A. S. **Clonación y expresión de proteínas recombinantes NS1 y NS3 del virus del dengue tipo 3**. 2013. 46f. Dissertación. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

El dengue es una enfermedad infecciosa con una elevada morbilidad y mortalidad causada por el virus del dengue (DENV). Según la Organización Mundial de la Salud, alrededor de 50 a 100 millones de personas se infectan anualmente en más de 100 países tropicales y subtropicales de todos los continentes. El espectro clínico de la infección por DENV puede incluir formas asintomáticas o sintomáticas que van desde una fiebre autolimitada e indeterminada, el dengue clásico (FD), hasta la enfermedad grave llamada fiebre del dengue hemorrágico/síndrome de choque del dengue (FHD/SCD). Recientemente ha habido un aumento dramático en el número de casos de FHD/SCD en las Américas y este aumento coincidió con la introducción del dengue tipo 3, genotipo III. El objetivo del presente estudio fue la clonación y expresión de las proteínas NS1 y NS3 del virus del dengue tipo 3. Las proteínas NS1 y NS3 de DENV-3 fueron clonados con éxito y expresadas en un sistema procariota. La amplificación de los genes NS1 y proteínas NS3 se realizó por RT-PCR, el cual generó amplicones de aproximadamente 1050 y 1850 pb, respectivamente. Los genes fueron clonados mediante la inserción de los amplicones en el vector plasmidial pCR-XL. Los genes de NS1 y NS3 fueron subclonados en el vector de expresión pQE-30 utilizando los sitios de restricción para las enzimas *BamHI* y *HindIII*. La expresión de las proteínas se obtuvo en un sistema procariota utilizando la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, dando lugar a proteínas de 45 kDa y 70 que fueron confirmadas por análisis en *Western blot* usando como anticuerpo primario fluido ascítico de ratón inmune y suero de pacientes con dengue. Estas proteínas virales pueden ser utilizadas para estudios relacionados a la patogénesis, replicación e mecanismos de escape del sistema inmune del DENV, adicionalmente, pueden ser potenciales antígenos en métodos de diagnóstico.

Palabras clave: Virus del dengue, la clonación, expresión, proteínas recombinantes, NS1, NS3.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura esquemática da partícula viral.** RNA viral circundado por um nucleocapsídeo icosaédrico formado pela proteína C. O vírus apresenta um envelope derivado das células hospedeiras, no qual encontram-se ancoradas as proteínas E em dímeros e a proteína M. Fonte: <http://viralzone.expasy.org/>..... 4
- Figura 2. Organização genômica do vírus da dengue.** O genoma do vírus da dengue é constituído de aproximadamente 11kb o qual codifica uma única poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares e viral em três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (PERERA; KUHN, 2008)..... 5
- Figura 3. Ciclo de multiplicação viral.** O ciclo inicia com a adsorção do vírus à célula-alvo através da ligação da proteína E ao receptor celular (A). Após entrada por endocitose (B), a acidificação das vesículas endossomais promovem mudanças conformacionais na proteína E o que contribui para o desnudamento da partícula viral e liberação do genoma no citoplasma (6.0). Em seguida o ssRNA(+) é transcrito em uma única poliproteína que é processada por proteases virais e celulares (C) e ocorre a replicação do RNA viral (D). A montagem da progênie viral ocorre no *lumen* do RER (E), através do arranjo entre proteínas estruturais e fitas de RNA recém-sintetizadas. Os virions imaturos formados são transportados até o Complexo de Golgi (6.7) e são processados pela enzima furina da célula hospedeira (F), gerando partículas infecciosas maduras (5.7), as quais são liberadas por exocitose (G) (PERERA et al., 2008). 7
- Figura 4. Mapa do vetor de clonagem pCR-XL-TOPO (Invitrogen, EUA).** *pUC ori*: origem de replicação do vetor pUC, *P_{lac}*: promotor do gene Lac, *M13 priming site (forward/reverse)*: sítios de ligação dos *primers* de sequenciamento M13, múltiplos sítios de clonagem com as enzimas de restrição indicadas, *T7 promoter/priming site*: sítio de ligação promotor T7 e do respectivo *primer*, *lacZ*□: gene lacZ da β-galactosidase, *ccdB*: gene ccdB letal, *Kanamycin*: gene de resistência a canamicina, *Zeocin*: gene de resistência a zeocina. **Fonte:** Topo XL PCR Cloning Kit - Five-minute cloning of long (3-10 kb) PCR products 2004 (Invitrogen, EUA)..... 19
- Figura 5. Mapa do vetor de expressão pQE-30 (QIAGEN, EUA).** *PT5*: promotor T5, *lac O*: operador lac, *RBS*: sítio de ligação do ribossomo, *ATG*: códon de iniciação, *6xHis*: sequência codificadora da cauda de histidina, **MCS*: sítio de clonagem com as enzimas de restrição indicadas, *Stop Codons*: códons de parada, *Ampicilin*: gene de resistência a ampicilina, *Col E1*: Origem de replicação Col E1. **Fonte:** *The QIAexpressionist - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins 2003* (QIAGEN, EUA). 21
- Figura 6. Amplificação dos genes das proteínas NS1 e NS3 do DENV-3.** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) Produto da PCR utilizando os *primers* para o gene da proteína NS1. **B)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) Produto da PCR utilizando os *primers* para o gene da proteína NS3..... 25
- Figura 7. Purificação do gel dos amplicons das proteínas NS1 e NS3.** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) *Amplicons* do gene da proteína NS1. **B)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) *Amplicons* do gene da proteína NS3..... 26

Figura 8. Análise das colônias brancas após transformação. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) e (15) pCR-XL-TOPO das colônias azuis; (2) ao (14) pCR-XL-NS1 das colônias brancas. **B)** (1) e (5) pCR-XL-TOPO das colônias azuis; (2) ao (4) pCR-XL-NS3 das colônias brancas..... 26

Figura 9. Dupla digestão enzimática do vetor pCR-XL contendo os genes das proteínas NS1 e NS3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) pCR-XL-NS1 digerido com *Bam HI* e *Hind III* (2) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA). **B)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) pCR-XL-NS3 digerido com *Bam HI* e *Hind III*. 27

Figura 10. Purificação dos insertos correspondentes aos genes das proteínas NS1 e NS3 após digestão com *Bam HI* e *Hind III* e do vetor de expressão pQE-30. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) pQE-30 não digerido; (3) pQE-30 digerido com *Bam HI* e *Hind III*; (4) pCR-XL-NS1 não digerido; (5) NS1. **B)** (1) NS3; (2) pCR-XL-NS3 não digerido; (3) pQE-30 digerido com *Bam HI* e *Hind III*; (4) pQE-30 não digerido. 28

Figura 11. Screening das colônias após transformação com os plasmídeos de expressão. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) pQE-30; (2) ao (5) pQE-30-NS1. **B)** (1) pQE-30; (2) ao (5) pQE-30-NS3. 28

Figura 12. Expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do DENV-3. Eletroforese SDS-PAGE 12% corado com *comassie blue* e visualizado em transiluminador de luz branca. **A)** (1) *E. coli* M15 não induzida, (2) Controle de expressão (proteína N de OROV); (3) ao (6) *E. coli* M15 contendo pQE-30-NS1 após 1, 2, 3 e 4h de indução. **B)** (1) *E. coli* M15 não induzida, (2) Controle de expressão (proteína N de OROV); (3) ao (6) *E. coli* M15 contendo pQE-30-NS3 após 1, 2, 3 e 4h de indução. . 29

Figura 13. Purificação do plasmídeo pQ30 contendo os genes das proteínas NS1 e NS3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) pQE-30; (2) ao (4) pQE-30-NS1. **B)** (1) pQE-30; (2) e (3) pQE-30-NS3. 30

Figura 14. Screening das colônias após transformação com os plasmídeos de expressão. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) e (11) pQE-30; (2) ao (10) pQE-30-NS1. **B)** (1) e (7) pQE-30; (2) ao (6) pQE-30-NS3. 30

Figura 15. Expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do DENV-3. Eletroforese SDS-PAGE 12% corado com *comassie blue* e visualizado em transiluminador de luz branca. **A)** (1) BL21(DE3) pQE-30-NS1 não induzido; (2) BL21(DE3) pQE-30-NS1 induzido; (3) BL21(DE3) pQE-30-NS3 não induzido; (4) BL21(DE3) pQE-30-NS1 induzido; (5) Marcador (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen, EUA). **B)** Controle positivo de indução da expressão. (1) BL21(DE3) pQE-30-N (OROV) não induzido; (2) BL21(DE3) pQE-30-N (OROV) induzido. 31

Figura 16. Western blot das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do DENV-3. **A)** Eletroforese SDS-PAGE 12% corado com *comassie blue* e visualizado em transiluminador de luz branca. 1) Marcador (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen, EUA); (2) NS1; (3) NS3; (4) controle negativo não induzido; (5) pGS21a/GST. **B)** Western blot. 32

Figura 17. Expressão e imunodeteção da proteína NS1 de DENV-3. **A)** Gel de poliacrilamida: (1) Marcador de peso molecular (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen, EUA), (2) BL21(DE3) pQE-

30/NS1 não induzida, (3) BL21(DE3) pQE-30/NS1 induzida. **B)** *Western blot* de BL21(DE3) pQE-30/NS1 induzida e analisada com (1) soro de indivíduo sadio, (2) Pool de soros de pacientes com dengue, (3) MIAF DENV, (4) soro de camundongo não imune, (5) ao (10) soros de pacientes com dengue indicados na Tabela 2 [(5) soro 2, (6) soro 3, (7) soro 4, (8) soro 5, (9) soro 6, (10) soro 7]... 33

Figura 18. Expressão e imunodeteção da proteína NS3 de DENV-3. **A)** Gel de poliacrilamida: (1) Marcador (BenchMark Protein Ladder - Invitrogen), (2) BL21(DE3) pQE-30/NS3 não induzida, (3) BL21(DE3) pQE-30/NS3 induzida. **B)** *Western blot* de BL21(DE3) pQE-30/NS1 induzida e analisada com: (1) soro 1 de indivíduo sadio, (2) Pool de soros de pacientes com dengue, (3) MIAF DENV, (4) soro de camundongo não imune, (5) ao (10) soros de pacientes com dengue indicados na Tabela 2 [(5) soro 2, (6) soro 3, (7) soro 4, (8) soro 5, (9) soro 6, (10) soro 7]. 33

Figura 19. Sítios de clivagem interna da proteína NS3. Modificado de (BERA; KUHN; SMITH, 2007). 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes das proteínas NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3.....	17
Tabela 2 - Soros de pacientes com dengue utilizados no <i>Western blot</i>.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 6xHis:** Cauda de poli-histidina
- AP:** Fosfatase Alcalina (*Alkaline Phosphatase*)
- BCIP:** 5-Bromo-4-Cloro-3-indolyl-fosfato
- cDNA:** DNA complementar
- CF:** Fixação do Complemento
- DENV:** Vírus da Dengue (*Dengue vírus*)
- DF:** Febre por dengue
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- dNTPs:** Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- EDTA:** Ácido etileno-diamino tetra-acético (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- ELISA:** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- FDA:** *Food and Drug Administration*
- FHD:** Febre Hemorrágica por Dengue
- IgG:** Imunoglobulina do tipo G
- IgM:** Imunoglobulina do tipo M
- IH :** inibição da hemaglutinação
- IPTG:** Isopropil- β -D-tiogalactopirósídeo
- kb:** quilo base (1000 pb)
- kDa:** quilo Dalton
- LB:** Meio Luria Bertani
- M:** Molar
- mAb:** Anticorpo monoclonal
- MAC/ELISA:** *IgM Antibody-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- mg:** Miligrama
- MgCl₂:** Cloreto de magnésio
- MIAF:** Fluido ascítico imune murino
- Min:** Minuto(s)
- mL:** Mililitro
- mM:** Milimolar
- MS:** Ministério da Saúde
- NaCl:** Cloreto de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

nm: nanômetro

O.D: Densidade ótica no comprimento de onda (λ)

ORF: *open reading frame*

OROV: Vírus Oropouche

pb: Pares de bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

r.p.m: Rotações por minuto

RDRP : RNA Polimerases RNA Dependentes

RER: Retículo Endoplasmático Rugoso

RN: Reação de neutralização

RNA: Ácido Ribonucléico

RT-PCR: transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase

SCD: Síndrome do Choque por Dengue

SDS: Dodecil Sulfato Sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (*Sodium dodecyl sulfate - polyacrilamide gel eletrophoresis*)

SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde

TE: Tampão Tris-EDTA

TEMED: N, N, N', N'- Tetrametiletilenodiamina

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

U: Unidade (s)

UV: luz ultravioleta

V: Volts

WHO ou OMS: Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*).

μ L: Microlitro

μ M: Micromolar

Sumário

Resumo	i
ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dengue	1
1.2 Histórico	2
1.3 Vetor e ciclo de transmissão.....	3
1.4 Vírus da Dengue – Características da partícula viral	4
1.5 Ciclo de multiplicação viral	5
1.6 Proteínas virais	8
1.7 Diagnóstico laboratorial	10
1.7.1 Isolamento viral.....	11
1.7.2 Detecção viral.....	11
1.7.3 Detecção do genoma viral	11
1.7.3.1 Detecção de antígenos	12
1.7.4 Sorologia	13
1.7.4.1 Detecção de anticorpos.....	13
1.8 Sistema de expressão procarioto para produção de proteínas recombinantes	14
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos Específicos	16
3.3 Produção das proteínas NS1 e NS3 recombinantes.....	17

3.3.1	Cepa viral	17
3.3.2	Extração do RNA viral e amplificação das proteínas NS1 e NS3.....	17
3.3.3	Clonagem dos fragmentos de cDNA.....	18
3.3.4	Purificação dos plasmídeos contendo inserto.....	20
3.3.5	Sequenciamento nucleotídico do cDNA clonado.....	20
3.3.6	Subclonagem dos genes das proteínas NS1 e NS3 em vetores de expressão.....	20
3.3.7	Indução e expressão das proteínas recombinantes	22
3.4	Confirmação da expressão das proteínas recombinantes por Western blot.....	22
3.4.1	Utilizando como anticorpo primário soro imune de camundongos.....	22
3.4.2	Utilizando como anticorpo primário soro de pacientes com dengue.....	23
4	RESULTADOS	25
4.1	Amplificação e clonagem dos genes das proteínas NS1 e NS3	25
4.2	Subclonagem dos genes das proteínas NS1 e NS3 no vetor de expressão pQE-30	27
4.3	Indução e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 em E. coli M15.....	29
4.4	Transformação de células E. coli BL21(DE3)	30
4.5	Indução e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 em E. coli BL21(DE3).	31
4.6	Confirmação da expressão das proteínas recombinantes por Western blot.....	31
4.6.1	Utilizando como anticorpo primário soro imune de camundongos.....	31
4.6.2	Utilizando como anticorpo primário soro de pacientes com dengue.....	32
5	DISCUSSÃO.....	34
6	CONCLUSÕES.....	38
7	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa causada pelo vírus da dengue (DENV), o qual foi isolado pela primeira vez em 1943 por SUSUMO HOTTA durante uma epidemia ocorrida em Nagasaki, Japão (KIMURA; HOTTA, 1944). A doença foi reconhecida como entidade clínica a partir de 1779 (SILER; HALL; KITCHENS, 1926), fato confirmado pela organização mundial da saúde (OMS), que afirma que a dengue tem sido relatada no mundo desde o século 17. A dengue é a mais importante doença viral humana transmitida por vetores artrópodes (DAMONTE; PUJOL; COTO, 2004; RIGAU-PEREZ et al., 1998). Foi descrito na Ásia e na África um ciclo selvagem envolvendo primatas como reservatórios da doença e o mosquito *Aedes* como principal vetor. A espécie transmissora do DENV mais conhecida e descrita é o *A. aegypti*. No entanto, as espécies *A. Albopictus*, *A. africanus* e *A. luteocephalus* encontradas na África são também potenciais vetores do DENV (GUBLER; CLARK, 1995; HALSTEAD, 2008).

Atualmente, o DENV está completamente adaptado ao ambiente urbano, não necessitando mais do ambiente silvestre para propagação (GUBLER, 2002). As mudanças ecológicas no ambiente após a segunda guerra mundial expandiram a distribuição geográfica do mosquito *Aedes*, assim como a urbanização e o desenvolvimento dos meios de transporte, contribuíram muito para o aumento da doença em regiões tropicais e subtropicais (OISHI et al., 2007). Ao longo dos últimos 50 anos, a incidência global da dengue aumentou 30 vezes, e estima-se que cerca de 50-100 milhões de infecções ocorrem anualmente, em mais de 100 países endêmicos, colocando quase metade da população do mundo em risco.

Atualmente, o método de controle da doença baseia-se no combate ao vetor, apesar da existência de vários candidatos a vacina, o único tratamento disponível é sintomático e de suporte de vida nas formas graves da doença (GUZMAN; KOURI, 2003; HEINZ; STIASNY, 2012; WHO, 2012).

As manifestações clínicas da doença variam de infecções assintomáticas, febre indeterminada e autolimitada, passando pela febre clássica da dengue (FD) a doenças mais graves caracterizadas por hemorragia como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e choque na síndrome do choque da dengue (SCD).

Na forma clássica da doença, o início dos sintomas ocorre 2 a 8 dias após a picada do mosquito, com febre elevada que dura de 2 a 7 dias, cefaleia intensa, calafrios, dor retro-

orbitária e astenia (fraqueza e cansaço), além de dor musculoesquelética e abdominal intensas o que levou a doença a ser conhecida inicialmente como “febre quebra ossos”.

A febre hemorrágica da dengue e a síndrome do choque da dengue caracterizam-se por aumento da permeabilidade capilar, alterações no número e função dos leucócitos, aumento do hematócrito, trombocitopenia e classifica-se em quatro graus de gravidade (I-IV). Os fenômenos de extravasamento do plasma, provocados por alterações na permeabilidade vascular para as cavidades serosas do corpo podem resultar em choque hipovolêmico. Coincidindo com a defervescência (entre o terceiro e o quinto dia) ou logo após, podem ocorrer exantema máculopapular ou morbiliforme difuso, que inicia no tronco.

As demais manifestações clínicas são idênticas às da FD até o primeiro momento de defervescência, quando se podem notar sinais clínicos de hipoperfusão tecidual e trombocitopenia importante que é acompanhada de petéquias disseminadas, equimoses espontâneas e sangramento das mucosas e dos sítios de punção venosa.

Quando um indivíduo se infecta com o DENV não é possível saber se desenvolverá formas mais leves da doença ou se evoluirá para FHD/SCD. São considerados fatores de risco para FHD/SCD as altas taxas de infestação pelo *Aedes aegypti*, a co-circulação dos quatro sorotipos do vírus, a infecção secundária pelo hospedeiro, as altas densidades populacionais e o intenso deslocamento geográfico das pessoas. A infecção pelo DENV produz imunidade duradoura sorotipo específica, mas nunca imunidade cruzada.

Os mecanismos que determinam a ampla variação das formas clínicas ainda não são totalmente esclarecidos. O curso e desfecho da infecção são influenciados por fatores específicos tanto do vírus quanto do hospedeiro e a combinação deles está envolvida na patogênese das formas hemorrágicas. Entre os fatores importantes para o hospedeiro podemos citar a idade, susceptibilidade genética, infecção prévia e imunidade heteróloga (HALSTEAD, 1970).

1.2 Histórico

A dengue é conhecida nas Américas desde o século XVIII sendo a primeira descrição de epidemia feita por BENJAMIM RUSH em 1780 na Filadélfia, Estados Unidos da América (EUA). O marco da reemergência da dengue nas Américas foi a introdução do DENV-1 em 1977 e, já na década de 1980, países como Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador e Peru, que não tinham sofrido com a dengue ou estavam livres da doença durante várias décadas, foram afetados pela explosão de epidemias causadas pelo DENV-1.

Cuba, em 1981, registrou a primeira grande epidemia de FHD nas Américas, com um total de 344203 casos notificados dos quais 10312 foram classificados como graves. Houve 116143 hospitalizações, 158 óbitos e custos que excederam a cifra dos US\$ 103 milhões (MARTINEZ TORRES, 2006). Esta epidemia de FHD cubana foi associada ao DENV-2 e ocorreu quatro anos o DENV-1 após ter sido introduzido na ilha cuja epidemia de FD já havia afetado quase metade da população do país (KOURI, G. P. et al., 1989).

O controle da epidemia foi obtido pela erradicação do *A. aegypti* da ilha que se tornou livre da dengue até 1997 quando nova epidemia afetou a província de Santiago onde foram notificados 2946 casos dos quais 205 eram FHD com 12 mortes (GUZMAN; KOURI; HALSTEAD, 2000; GUZMAN; KOURI; VALDES; et al., 2000; KOURI, G. et al., 1998; RODRIGUEZ-ROCHE et al., 2005).

A FHD em Cuba foi o mais importante evento histórico da dengue nas Américas. Entre os fatores que contribuíram para a emergência da FD/FHD podem ser incluídos o rápido crescimento populacional e urbanização da América Latina e Caribe, o aumento do número de pessoas se deslocando geograficamente facilitando a disseminação da virose, e a circulação dos quatro sorotipos nas Américas gerando um estado de hiperendemicidade aumentando o risco de FHD e a pouca eficiência dos programas de controle do vetor (STODDARD et al., 2012; WILDER-SMITH, 2012; WILSON, 2003).

1.3 Vetor e ciclo de transmissão

Os mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes africanus*) desempenham um papel importante na transmissão do vírus. Embora o principal vetor seja o *A. aegypti*, o *A. albopictus* e *A. polynesiensis* também podem atuar como vetores, dependendo da localização geográfica (EFFLER et al., 2005; MALAVIGE et al., 2004; WHO, 2012).

Os mosquitos transmissores podem ser encontrados em praticamente todas as regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. São encontrados no ambiente urbano e, principalmente, dentro das casas. Isso maximiza o contato homem-vetor e minimiza o contato com inseticidas pulverizados fora das casas, o que dificulta o controle deste vetor (PERICH et al., 2000).

O mosquito se reproduz na água parada de pequenos reservatórios como pneus, vasos de plantas ou qualquer local onde acumule água. Os ovos podem sobreviver por longos períodos de tempo, uma vez que são capazes de resistir à dessecação. A disposição inadequada do lixo ou drenagem inadequada das águas residuais, consequências da

urbanização não planejada, pode ser responsável por altas densidades do mosquito em áreas endêmicas (MALAVIGE et al., 2004).

Aumentos significativos nas populações de larvas do mosquito são vistos durante a estação chuvosa. Esta pode ser uma razão pela qual as epidemias de dengue tendem a coincidir com a época das chuvas (THAVARA et al., 2001).

Durante o repasto sanguíneo em um humano infectado, a fêmea adulta do mosquito ingere o vírus da dengue. Primeiro, o vírus replica-se no intestino médio, atinge a hemocele e a hemolinfa, e, em seguida, obtém acesso aos diferentes tecidos do inseto. Após a replicação viral nas glândulas salivares, o mosquito infectado pode transmitir o vírus para outro humano.

1.4 Vírus da Dengue – Características da partícula viral

O DENV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, sendo reconhecidos quatro sorotipos antigenicamente relacionados designados de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (WESTAWAY et al., 1985). Os *virions* consistem de pequenas partículas esféricas de 40 a 50 nm de diâmetro, contendo um core elétron denso de 30 nm envolto por um envelope bilipídico, no qual estão ancoradas duas proteínas virais E (envelope) e M (membrana) (LINDENBACH, B. D.; THIEL; CHARLES M. RICE, 2007; WESTAWAY et al., 1985).

Figura 1. Estrutura esquemática da partícula viral. RNA viral circundado por um nucleocapsídeo icosaédrico formado pela proteína C. O vírus apresenta um envelope derivado das células hospedeiras, no qual encontram-se ancoradas as proteínas E em dímeros e a proteína M. **Fonte:** <http://viralzone.expasy.org/>

Cada partícula possui um genoma de RNA fita simples polaridade positiva com aproximadamente 11 kb o qual apresenta um cap ($m^7G5'ppp5'$ A) no extremo 5', mas não apresenta cauda poliadenilada no extremo 3'. Este genoma apresenta apenas uma fase de leitura (*open reading frame*, ORF), a qual codifica uma única poliproteína que posteriormente

é clivada por proteases celulares e virais em 3 proteínas estruturais que protegem o RNA - a proteína do nucleocapsídeo (C), proteína associada à membrana (M), (expressa como prM, um precursor para M) e proteína do envelope (E) - e 7 não estruturais (NS) - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 - que são essenciais para a replicação viral (LINDENBACH, B. D; et al., 2007; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; RICE et al., 1985).

Nas extremidades 5' e 3' do genoma existem regiões não codificadoras (RNC5', RNC3') com aproximadamente 100 e 450 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de replicação, tradução e empacotamento viral (LINDENBACH, B. D; et al., 2007).

Figura 2. Organização genômica do vírus da dengue. O genoma do vírus da dengue é constituído de aproximadamente 11kb o qual codifica uma única poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares e viral em três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (PERERA; KUHN, 2008).

1.5 Ciclo de multiplicação viral

O DENV penetra na célula hospedeira via endocitose mediada por receptores (Figura 3). O ciclo de replicação inicia-se com a adsorção da partícula viral à célula-alvo através da ligação da proteína E a receptores específicos presentes na membrana celular. Interações entre a proteína E e a molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas (DC-SIGN) são essenciais para a infecção destas células e para internalização eficiente da partícula viral por endocitose mediada por clatrina (LOZACH et al., 2005).

Após a endocitose, os endossomos fundem-se com lisossomos, levando a uma diminuição do pH intra-endossômico, o que potencializa mudanças conformacionais na proteína E aproximando o envelope viral à membrana do endossomo, resultando na fusão do envelope viral com a membrana das vesículas endossomais e consequentemente, a dissociação do nucleocapsídeo e liberação do genoma no citoplasma (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; LINDENBACH, B. D; et al., 2007; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008).

O RNA livre no citoplasma prontamente codifica um precursor da poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos. Esse polipeptídeo traduzido sofre processamento co- e pós-transducional através de clivagens realizadas por proteases virais e do hospedeiro originando três proteínas virais estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas prM, E e NS1 são direcionadas para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER), em cuja membrana permanecem ancoradas, enquanto que a proteína C e as outras proteínas não estruturais incluindo a NS1 são liberadas no citoplasma da célula (LINDENBACH, B. D; et al., 2007).

A replicase viral é montada a partir das proteínas NS3 e NS5, as quais atuam sobre o RNA viral provavelmente auxiliadas por alguns fatores do hospedeiro. O genoma viral é replicado por meio de um intermediário de uma cadeia negativa do RNA (ssRNA-), que serve como molde para a síntese de várias cópias de RNAs de cadeia positiva (ssRNA+).

A montagem do *virion* acontece em associação com membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER). A proteína C junto com o RNA formam o nucleocapsídeo, o qual se liga à porção citoplasmática dos heterodímeros das glicoproteínas prM e E ancoradas na membrana bilipídica do retículo endoplasmático, resultando na montagem das partículas virais por brotamento para dentro do *lúmen* do retículo endoplasmático. Nesta fase as partículas virais formadas são imaturas e não infecciosas.

Esses vírus imaturos são transportados pela via secretora celular até o Complexo de Golgi; onde, no ambiente de baixo pH da face trans do complexo, ocorre a clivagem por furinas da proteína prM em M (proteína de membrana) levando a maturação da partícula viral. A maturação promove um rearranjo no envelope viral com a liberação do peptídeo “pr” (86 aminoácidos), que é secretado no meio extracelular. Posteriormente, as partículas virais são liberadas para o meio extracelular pela via exocítica.

Devido a diferenças no meio intracelular e pela natureza não-lítica do ciclo dos *Flavivirus*, a entrada, a replicação e o envelopamento desses vírus pode diferir nas células de

mosquitos em comparação às células de vertebrados (DAMONTE et al., 2004; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; LINDENBACH, B. D; et al., 2007; MUKHOPADHYAY et al., 2005; PERERA et al., 2008).

Figura 3. Ciclo de multiplicação viral. O ciclo inicia com a adsorção do vírus à célula-alvo através da ligação da proteína E ao receptor celular (A). Após entrada por endocitose (B), a acidificação das vesículas endossomais promovem mudanças conformacionais na proteína E o que contribui para o desnudamento da partícula viral e liberação do genoma no citoplasma (6.0). Em seguida o ssRNA(+) é transcrito em uma única poliproteína que é processada por proteases virais e celulares (C) e ocorre a replicação do RNA viral (D). A montagem da progênie viral ocorre no *lumen* do RER (E), através do arranjo entre proteínas estruturais e fitas de RNA recém-sintetizadas. Os virions imaturos formados são transportados até o Complexo de Golgi (6.7) e são processados pela enzima furina da célula hospedeira (F), gerando partículas infecciosas maduras (5.7), as quais são liberadas por exocitose (G) (PERERA et al., 2008).

Poucos receptores que medeiam a interação dos flavivírus com a célula hospedeira têm sido descritos. Entretanto várias moléculas de superfície já foram propostas para a interação vírus-célula. Recentemente foi mostrado que DC-SIGN (lectina específica de manose), amplamente distribuídas na superfície de células dendríticas (DC), interage com os açúcares da proteína E. Esta interação seria o primeiro contato vírus-célula, a qual facilitaria a ligação da proteína E com o receptor celular ainda desconhecido (BARBA-SPAETH et al.,

2005; LINDENBACH, B. D; et al., 2007; LOZACH et al., 2005; MUKHOPADHYAY et al., 2005).

Sabe-se também que resíduos da proteína E carregados positivamente poderiam interagir com o heparansulfato, que está amplamente distribuído em muitas linhagens celulares e consequentemente facilitaria a infecção da célula (CHEN, Y. et al., 1997; KROSCHEWSKI et al., 2003).

1.6 Proteínas virais

A proteína do capsídeo (C) é uma proteína altamente básica de ≈ 12 kDa que junto ao RNA viral forma o nucleocapsídeo (CHAMBERS; HAHN; et al., 1990). Os resíduos básicos dessa proteína estão concentrados nas extremidades N- e C-terminais e provavelmente atuam cooperativamente na ligação com o RNA genômico (LINDENBACH, B. D; et al., 2007). Existe ainda uma região central hidrofóbica que medeia a associação com a membrana do envelope.

A proteína C nascente apresenta uma âncora hidrofóbica C-terminal, a qual funciona como um peptídeo sinal para a translocação da proteína prM no RER. Este domínio hidrofóbico é clivado da proteína C madura pela serino-protease viral (LOBIGS, 1993). A proteína C é encontrada em dímeros onde cada monômero contém 4 alfa hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) (MA et al., 2004). Ainda não é clara a forma como os dímeros da proteína C são organizados dentro do nucleocapsídeo, mas a interação com o RNA pode induzir dímeros isolados a se montarem em partículas de nucleocapsídeo (ASSENBERG et al., 2009).

A glicoproteína prM de ≈ 26 kDa é uma das duas proteínas do envelope dos *virions* imaturos. Durante o processo de transformação da partícula viral imatura em partícula viral madura ocorrem algumas modificações na via secretora (PAROUTIS; TOURET; GRINSTEIN, 2004; ZHANG et al., 2003; ZHANG et al., 2007). A prM é clivada pela enzima furina residente no trans-Golgi, dando origem à proteína M de ≈ 8 kDa, presente no *virion* maduro, e também ao peptídeo "pr" (86 aminoácidos) que é secretado no meio extracelular (KEELAPANG et al., 2004; PAROUTIS et al., 2004; ZHANG et al., 2003; ZHANG et al., 2007).

A glicoproteína E de 50-55 kDa é o principal componente da superfície do vírus e a responsável pelas propriedades fenotípica, antigênica, tropismo e também pela entrada do vírus na célula (ANDERSON; KING; INNIS, 1992; BEASLEY; AASKOV, 2001; CHEN,

Y.; MAGUIRE; MARKS, 1996; CRILL; ROEHRIG, 2001; HE et al., 1995; LEITMEYER et al., 1999).

A resolução da estrutura cristalográfica revelou que o ectodomínio da proteína E se encontra organizado em três domínios funcionais (I,II,III) (MODIS et al., 2004;2005). Os domínios I e II participam na entrada e penetração do vírus dentro das células e o domínio III está envolvido no tropismo, virulência e escape dos anticorpos neutralizantes (MODIS et al., 2004;2005). A proteína E encontra-se ancorada no envelope viral através de domínios transmembrana, os quais são estruturas alfa-hélices antiparalelas (ZHANG et al., 2003).

A glicoproteína NS1 de ≈ 45 kDa existe em múltiplas estruturas (monômero, dímero e hexâmetro) e pode ser expressa em três formas: *a*) na superfície da célula ancorada dentro da membrana celular através do grupo glicosil-fosfatidilinositol (STOHLMAN et al., 1975; WESTAWAY; GOODMAN, 1987); *b*) na região perinuclear (WESTAWAY; GOODMAN, 1987); *c*) e na forma solúvel (ALCON et al., 2002; LIBRATY et al., 2002) que por sua vez pode ser secretada pelas células infectadas, o que também pode explicar a produção de anticorpos contra esta proteína e sua detecção no soro de pacientes antes mesmo do RNA viral ser detectado por RT-PCR (ALCON et al., 2002).

A função da NS1 ainda não é bem conhecida, mas foi observado que mutações na proteína NS1 afeta o início da produção da fita negativa do RNA (LINDENBACH, B. D.; RICE, 1997; MUYLAERT; GALLER; RICE, 1997). NS1 teria participação na fase precoce da replicação do RNA viral, montagem, maturação e, possivelmente, estaria envolvida na patogênese da doença (AVIRUTNAN et al., 2006; AVIRUTNAN et al., 2007; MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996).

NS2A de ≈ 22 kDa é uma pequena proteína hidrofóbica multifuncional, encontrada em associação às membranas celulares e envolvida na replicação viral atuando também como uma virosporina (inserção da proteína NS2A dentro da membrana, seguida pela oligomerização gerando poros hidrofílicos, permitindo o fluxo de moléculas pequenas através dela) (CHAMBERS; MCCOURT; RICE, 1989; LEUNG, J. Y. et al., 2008; MACKENZIE et al., 1998).

NS2A se liga com alta afinidade com a região RNC3' do RNA viral e outros componentes do complexo de replicação, transportando os RNAs para a região de empacotamento e montagem das partículas virais (KUMMERER; RICE, 2002; LIU; CHEN; KHROMYKH, 2003; LIU et al., 2004; MACKENZIE et al., 1998).

NS2B de ≈ 14 kDa é uma proteína de membrana com 2 domínios hidrofóbicos, os quais rodeiam uma região hidrofílica conservada. Esta proteína forma um complexo com o domínio protease da NS3, funcionando como um co-fator para a atividade protease de NS3 (LUO et al., 2008).

A NS3 é uma proteína citoplasmática multifuncional com ≈ 70 kDa apresentando atividades enzimáticas relativas ao processamento da poliproteína e à replicação do RNA viral sendo também, a segunda maior proteína viral. Esta constituída basicamente por dois domínios funcionais: protease e helicase, no N- e C-terminal, respectivamente (CHAMBERS; WEIR; et al., 1990; LUO et al., 2008).

O domínio serino/protease nos primeiros 180 aminoácidos na extremidade N-terminal, é dependente de associação ao co-fator NS2B e este complexo é responsável pela clivagem das junções entre as proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5 além de gerar a extremidade C-terminal da proteína do capsídeo madura e NS4A e pode também clivar sítios internos na NS2A e na própria NS3 (LINDENBACH, B. D; et al., 2007).

Na ausência do co-fator NS2B, a proteína NS3 tende a formar agregados que a tornam inativa em sua função protease (ASSENBERG et al., 2009). A NS3 apresenta ainda uma atividade de helicase/NTPase no domínio helicase, envolvida no desenrolar da forma intermediária dsRNA (XU et al., 2006).

NS4A e NS4B são pequenas proteínas virais de 16 kDa e 27 kDa, respectivamente, com características altamente hidrofóbicas e estão associadas à membrana. Com base em sua distribuição sub-celular e interação com o complexo de replicação, acredita-se que ambas participam do processo de replicação do RNA viral (MILLER et al., 2007; MILLER; SPARACIO; BARTENSCHLAGER, 2006).

NS5 é a maior e mais conservada proteína viral ≈ 103 kDa, a qual contém sequências homólogas às RNA Polimerases RNA Dependentes (RDRP) de outros vírus de RNA de polaridade positiva. Apresenta homologia com domínios funcionais metiltransferase envolvidos na formação da estrutura cap 5' do RNA viral (CHAMBERS; HAHN; et al., 1990; KROSCHEWSKI et al., 2008; MUKHOPADHYAY et al., 2005; YAP et al., 2007).

1.7 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico clínico da dengue é difícil de ser realizado principalmente na fase aguda da doença quando os sintomas são muito similares aos de outras infecções febris agudas e o diagnóstico definitivo da infecção pelo DENV somente pode ser realizado em laboratório.

Os métodos de isolamento e identificação viral através da inoculação do material suspeito em cultura de células permanecem como padrão ouro, todavia os testes sorológicos para detecção de anticorpos dos tipos IgG e/ou IgM são os mais amplamente utilizados, além de metodologias mais recentes baseadas em técnicas de biologia molecular para detecção do RNA viral.

1.7.1 Isolamento viral

O isolamento viral por cultura celular é um método capaz de detectar a doença em seu estágio precoce e permanece como o padrão ouro para isolamento e identificação viral tendo grande importância tanto como ferramenta de pesquisa como para o diagnóstico. É um método com alta sensibilidade e especificidade tendo também como vantagens o baixo custo e a maior reprodutibilidade quando se faz necessário realizar um grande número de testes. Não é um teste utilizado na rotina principalmente porque demanda longo período de tempo (usualmente mais que sete dias) para se obter o resultado.

Os tipos de isolamento viral mais utilizados são, a inoculação viral intratorácica em mosquitos ou em cultura de células e a inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos. Os principais tipos celulares empregados são as células dos rins do macaco verde africano (Vero) e células de glândulas salivares de *A. albopictus* (C6/36) principalmente (GUZMAN; KOURI, 1996).

1.7.2 Detecção viral

1.7.2.1 Detecção do genoma viral

As técnicas moleculares de detecção do genoma viral apresentam importante papel no diagnóstico da dengue uma vez que incluem métodos capazes de identificar a doença precocemente. Os métodos mais conhecidos e utilizados são a hibridação, a transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional e a RT-PCR em tempo real.

A hibridação de ácidos nucléicos pode ser utilizada tanto para amostras clínicas quanto para tecidos fixados provenientes de autópsia. Devido à sua complexidade que demanda mão de obra especializada, a hibridação é de difícil aplicação na rotina sendo mais conveniente como ferramenta de pesquisa (GUBLER, 1998). A RT-PCR convencional é um método que possibilita a amplificação de sequências genômicas específicas do RNA viral delimitadas por iniciadores (*primers*).

Uma alíquota deste produto de amplificação deve ser submetida à eletroforese em gel de agarose seguida de coloração com corante fluorescente apropriado e só então é visualizado sob iluminação ultravioleta (UV). Este método apresenta altas sensibilidade e especificidade, mas as múltiplas etapas necessárias para sua realização fazem com que seja excessivamente laborioso e passível de contaminação com o próprio produto de amplificação gerando resultados falso positivos (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002).

A RT-PCR em tempo real, assim como a convencional possibilita a amplificação de fragmentos genômicos, contudo a detecção dos produtos é feita diretamente na própria plataforma de instrumentação utilizando marcadores fluorescentes e métodos sensíveis de mensuração da fluorescência emitida. Este método não requer manipulação após a amplificação, sendo por isso chamado de sistema fechado ou homogêneo. As principais vantagens deste sistema homogêneo consistem na redução do tempo necessário para a realização do teste, na possibilidade de quantificação da carga viral e no baixo risco de contaminação com o produto amplificado (NIESTERS, 2002).

1.7.2.2 Detecção de antígenos virais

A presença de antígenos virais no soro de pacientes durante a fase aguda é principalmente determinada por ELISA, utilizando enzimas conjugadas com biotina-estraptavidina (KITIGUL et al., 1997). Também é possível detectar antígenos em tecidos de biópsia e autópsia através de técnicas de imunohistoquímica, no entanto, estas técnicas não são muito utilizadas para o diagnóstico em países endêmicos (GUZMAN; KOURI, 2004).

A detecção da glicoproteína não estrutural 1 (NS1) é atualmente mais utilizada, devido ao fato desta proteína ser altamente conservada e expressa na superfície das células infectadas e principalmente ser secretada para a circulação sanguínea podendo ser detectada em amostras de soro de pacientes durante a fase aguda da infecção (ALCON et al., 2002; YOUNG et al., 2000).

Além disso, os níveis de NS1 estão correlacionados com os níveis de viremia no plasma e os níveis do antígeno NS1 também estão maiores em pacientes com FHD do que FD (LIBRATY et al., 2002). Desta forma, a detecção de antígenos pode representar, além de uma ferramenta diagnóstica, um teste de predição de gravidade de doença e também ser utilizada em estudos soropidemiológicos (ANANDARAO et al., 2006; XU et al., 2006).

1.7.3 Sorologia

São os métodos de diagnóstico mais amplamente utilizados e diagnosticam a doença através da detecção de anticorpos dirigidos contra o patógeno.

1.7.3.1 Detecção de anticorpos

Os principais métodos sorológicos utilizados para detecção de anticorpos antidengue são: inibição da hemaglutinação (IH), reação de fixação do complemento (FC), reação de neutralização (RN), ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e MAC-ELISA (*capture enzyme linked immunosorbent assay-IgG/IgM*). A IH, é o método padrão devido a sua alta sensibilidade e fácil execução, detectando anticorpos após vários anos de infecção e uma ferramenta útil em inquéritos epidemiológicos e na diferenciação das infecções primárias e secundárias.

As principais desvantagens deste método consistem em pouca especificidade, a necessidade de amostras pareadas e na incapacidade de identificar o sorotipo viral envolvido.

O teste de FC baseia-se no princípio de que o complemento será consumido pela reação antígeno-anticorpo. Os anticorpos detectados são específicos à infecção primária contribuindo para determinação do sorotipo, porém aparecem mais tarde permanecendo por curtos períodos limitando-se assim sua utilização para inquéritos epidemiológicos.

Este teste, não é utilizado rotineiramente para diagnóstico uma vez que é tecnicamente complicado e requer pessoal treinado para a correta interpretação dos resultados.

A reação de neutralização é o método sorológico mais sensível e específico podendo ser utilizado para identificar a infecção primária durante a fase de convalescença não sendo viável em infecções secundárias e terciárias. As desvantagens deste método consistem no alto custo, longo tempo necessário para a realização e na complexidade técnica.

O ELISA é considerado, atualmente, o mais útil teste de diagnóstico para dengue devido a sua alta sensibilidade e facilidade de execução, o qual não exige equipamentos sofisticados. Este teste é utilizado para detectar anticorpos tanto na fase aguda, a partir do quinto dia do início dos sintomas (IgM), quanto na convalescença (IgG), sendo que os títulos de IgM são significativamente mais elevados na infecção primária que nas infecções secundárias e terciárias quando sua produção é muito baixa e transitória.

Já o MAC-ELISA tem grande valor como ferramenta na vigilância epidemiológica devido a sua facilidade e rápida execução. A determinação dos títulos de IgG pode ser

utilizada para diferenciação entre infecção primária e secundária (DE PAULA; FONSECA, 2004).

As técnicas sorológicas de detecção de anticorpos apresentam altos índices de reações cruzadas exigindo antígenos específicos para cada um dos quatro sorotipos de DENV, para outros flavivírus e, dependendo da área geográfica, outros vírus que causam doenças com sintomas clínicos similares e tornam-se pouco viáveis para o diagnóstico precoce uma vez que detectam anticorpos a partir do quinto dia de instalação dos sintomas. No entanto, qualquer que seja o teste sorológico utilizado, o diagnóstico sorológico inequívoco depende do aumento nos títulos de anticorpos específicos entre a fase aguda e a convalescença (GUBLER, 1998).

1.8 Sistema de expressão procarioto para produção de proteínas recombinantes

Muitos anos se passaram após a primeira insulina recombinante ter sido aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA), a *Escherichia coli* ainda é largamente utilizada na indústria para a produção de agentes terapêuticos recombinantes (KAMIONKA, 2011). A *E. coli* é uma das espécies vivas mais intensamente estudadas (ELENA et al., 2005).

A *E. coli* pertence à família das *Enterobacteriaceae* apresentando a forma de um bacilo com múltiplos flagelos dispostos em volta da célula. São aeróbias e anaeróbias facultativas. O genoma está composto por quase 5 milhões de pares de bases e milhares de genes que codificam mais de 4000 proteínas (genoma humano tem 3 bilhões de pares de bases e cerca de 27 mil proteínas) (MADIGAN et al., 2010). A *E. coli* vive normalmente na microbiota do trato gastrointestinal de mamíferos, incluindo seres humanos, sendo normalmente um comensal inofensivo para estes hospedeiros (ELENA et al., 2005).

Entre os organismos procariotos, a *E. coli* é amplamente utilizada como sistema de expressão, devido ao baixo custo e à facilidade de manipulação. No entanto, estes sistemas de expressão, algumas vezes não são capazes de produzir proteínas recombinantes idênticas à selvagem devido à sua simplicidade. As bactérias não possuem mecanismos sofisticados para realizarem modificações pós-traducionais os quais estão presentes em organismos superiores.

Como consequência, muitas vezes a expressão de proteínas recombinantes é realizada em células de mamíferos. No entanto o baixo custo e simplicidade do cultivo bacteriano é uma vantagem imbatível sobre qualquer outro sistema de expressão, sendo, portanto a *E. coli*, sempre a escolha preferível tanto em escala laboratorial quanto industrial (KAMIONKA, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

A dengue é a doença viral transmitida por artrópodes de mais rápida propagação no mundo. Desta maneira as epidemias de dengue têm aumentado consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo. Considerando que as condições climáticas e ambientais no Brasil favorecem a proliferação do mosquito transmissor aumentando com isso o risco de contaminação e o surgimento de surtos, estudos de diferentes aspectos da doença e do vírus são de grande importância para aperfeiçoar os conhecimentos sobre a enfermidade e, da mesma maneira, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais simples e confiáveis para esse vírus se fazem necessários.

A produção de proteínas recombinantes é de grande interesse nesta área, já que as mesmas poderão ser utilizadas em diferentes frentes de pesquisa como no desenvolvimento de métodos de diagnóstico, produção de anticorpos monoclonais ou estudos de virologia básica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Expressar as proteínas NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3 em um sistema procarioto.

3.2 Objetivos Específicos

- Clonar os genes das proteínas NS1 e NS3 em vetor de expressão procarioto.
- Expressar as proteínas recombinantes NS1 e NS3.
- Avaliar a sororeatividade das proteínas recombinantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção das proteínas NS1 e NS3 recombinantes

4.1.1 Cepa viral

O isolado D3BR/RP1/2003 com código de acesso no *GenBank* EF643017 (número de passagem 5), um vírus de dengue tipo 3 brasileiro (AQUINO et al., 2006) teve seu RNA utilizado como molde para amplificação das sequências gênicas das proteínas recombinantes NS1 e NS3.

4.1.2 Extração do RNA viral e amplificação das proteínas NS1 e NS3

O RNA viral foi purificado a partir de 140 µl do sobrenadante de uma cultura de células C6/36 utilizando o kit de extração de RNA *QIAamp Viral RNA Kit* (QIAGEN, USA), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA extraído foi estocado à -70°C até o momento do uso.

A síntese do cDNA foi realizada por transcrição reversa (RT) em um volume total de 20 µl. Nesta reação foram utilizados, 10 µl de RNA, 100 ng de *random primers*, 0,125 mM de dNTP e 200 U da enzima transcriptase reversa M-MLV (EUA). A mistura foi incubada a 25°C por 10 min, seguida de uma incubação a 37°C, por 4 horas, a fim de obter uma quantidade suficiente de cDNA. Os híbridos resultantes de cDNA e RNA foram eliminados utilizando 1µl de RNase H (Invitrogen, EUA).

As sequências de DNA que codificam as proteínas NS1 e NS3 foram amplificadas pelo método de PCR convencional (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do cDNA obtido. Para essa reação foram utilizados os *primers* da tabela 1 desenhados com base na sequência nucleotídica da cepa D3BR/RP1/2003.

Tabela 1- Primers utilizados para amplificação dos genes das proteínas NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3.

<i>Primers</i>	Sequencia (‘5 – ‘3)	Tamanho do fragmento
NS1D3S/BamHI	GGA TCC GAC ATG GGA TGT GTT ATA AAC TGG AAA	1055 pb
NS1D3C/HindIII	AAG CTT CGC TGA GAC TAA AGA CTT TAC CAT GTT CTC	
NS3D3S/ BamHI	GGA TCC TCC GGC GTT CTA TGG GAC GTA CCC AGC	1856 pb
NS3D3C/ HindIII	AAG CTT CTT TCT GCC AGC CGC AAA GTC CTT GAA	

A reação de PCR utilizou: DNA molde (3μ); 0,2 mM de dNTP; 0,3 μM de cada *primer*; 1,5U de enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen, EUA); 5μl do tampão *10X High Fidelity PCR* (600 mM Tris-SO₄ - pH 8,9; 180 mM [(NH₄)₂ SO₄] e 2 mM de MgSO₄ [50 mM]. Água livre de DNase/RNase foi utilizada para completar o volume de 50 μl necessário para a reação. Para obter as melhores condições de amplificação foi utilizado o seguinte gradiente de temperatura no termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, BIO-RAD, EUA): uma temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos seguido de desnaturação de 94°C por 15 segundos, anelamento de 56°C por 30 segundos e uma temperatura de extensão de 68°C por 2 minutos, repetidas por 45 ciclos, e 68°C por 10 minutos para o término da extensão.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corados com GelRed (Biotium, EUA) por 30 minutos sob agitação; e finalmente as bandas foram visualizadas em luz ultravioleta (UV). Os fragmentos amplificados foram recuperados do gel utilizando o kit *Perfect Gel Cleanup Kit* (QIAGEN, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

Os produtos purificados foram eluídos com 30μl de água livre de DNase. Após a purificação, 3μl da amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose para a confirmação da purificação e posteriormente quantificação por espectrofotometria. Após amplificação os produtos gerados foram submetidos à clonagem com o vetor pCR^{XL}-TOPO (Invitrogen, EUA).

4.1.3 Clonagem dos fragmentos de cDNA

Para a clonagem dos fragmentos purificados, foi utilizado o vetor pCR-XL-TOPO (Invitrogen, EUA) o qual apresenta-se linearizado e com uma desoxitimidina (T) nas extremidades 3', utilizadas para a ligação por complementação de bases aos produtos de PCR que possuem desoxiadenosina (A) nas extremidades 3' adicionadas pela Taq polimerase durante a PCR.

Figura 4. Mapa do vetor de clonagem pCR-XL-TOPO (Invitrogen, EUA). *pUC ori*: origem de replicação do vetor pUC, *P_{lac}*: promotor do gene Lac, *M13 priming site (forward/reverse)*: sítios de ligação dos *primers* de sequenciamento M13, múltiplos sítios de clonagem com as enzimas de restrição indicadas, *T7 promoter/priming site*: sítio de ligação promotor T7 e do respectivo *primer*, *lacZ*: gene lacZ da β-galactosidase, *ccdB*: gene ccdB letal, *Kanamycin*: gene de resistência a canamicina, *Zeocin*: gene de resistência a zeocina. **Fonte:** Topo XL PCR Cloning Kit - Five-minute cloning of long (3-10 kb) PCR products 2004 (Invitrogen, EUA).

Os produtos de PCR purificados foram inseridos no vetor pCR-XL-TOPO, através de reação de clonagem TA do kit TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, EUA) e o produto da ligação foi utilizado para transformar células competentes *Escherichia coli*. Para realizar a transformação, foram preparadas células quimicamente competentes das seguintes cepas de *E. coli*: DH5α, Top10 e JM109.

O vetor pCR-XL-TOPO contém os sítios de clonagem TA localizados dentro do gene *LacZ*, o qual codifica para a enzima β-galactosidase. Essa enzima, quando expressa, degrada o substrato X-gal, adicionado ao meio de cultura produzindo um precipitado de cor azul.

Portanto, colônias de bactérias carregando o plasmídeo com o gene *LacZ* intacto (sem inserto), na presença do substrato X-gal, ficarão azuis, enquanto que, aquelas portando o plasmídeo que incorporou o inserto nos sítios de restrição, não expressam a β-galactosidase e permanecem de cor branca, o que facilita a identificação dos clones recombinantes.

Desta maneira para analisar as colônias obtidas após a transformação, cada colônia foi inoculada em 5 ml de meio líquido LB contendo canamicina [50µg/mL] e crescidas a 37°C por 14 horas com agitação de 200 rpm e as colônias brancas tiveram os plasmídeos extraídos utilizando a técnica da lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) e submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.1.4 Purificação dos plasmídeos contendo inserto

As colônias brancas contendo os plasmídeos de tamanho maior que o plasmídeo controle sem inserto após serem selecionadas, foram inoculadas em 10 mL de meio LB com canamicina e incubadas sob agitação à 37°C, por 14h, para a purificação dos plasmídeos.

Para a purificação dos plasmídeos livres de proteínas e RNA foi utilizado o kit *Qiagen Plasmid Mini Kit* (QIAGEN, EUA) e finalmente, as colônias bacterianas contendo os plasmídeos com o suposto inserto foram confirmadas pelo uso de enzimas de restrição (*BamHI* e *HindIII*) e para descartar a possibilidade de inserção de mutações, os plasmídeos que foram digeridos pelas enzimas de restrição foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico.

Além disso, uma parte da cultura das colônias positivas foi estocada com 15% de glicerol à -70°C.

4.1.5 Sequenciamento nucleotídico do cDNA clonado

Os plasmídeos purificados foram submetidos a sequenciamento nucleotídico com o kit *ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, EUA), utilizando os *primers* universais *M13 Forward* e *Reverse*, seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada no sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer® 8-capillary* (Applied Biosystems, EUA).

4.1.6 Subclonagem dos genes das proteínas NS1 e NS3 em vetores de expressão

Os genes das proteínas NS1 e NS3 foram subclonados no vetor de expressão pQE-30 (QIAGEN, EUA) através dos sítios de restrição *BamHI* e *HindIII*.

Figura 5. Mapa do vetor de expressão pQE-30 (QIAGEN, EUA). *PT5*: promotor T5, *lac O*: operador *lac*, *RBS*: sítio de ligação do ribossomo, *ATG*: códon de iniciação, *6xHis*: sequência codificadora da cauda de histidina, **MCS*: sítio de clonagem com as enzimas de restrição indicadas, *Stop Codons*: códons de parada, *Ampicillin*: gene de resistência a ampicilina, *Col E1*: Origem de replicação *Col E1*. **Fonte:** *The QIAexpressionist - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins 2003* (QIAGEN, EUA).

O plasmídeo de expressão pQE-30 foi submetido a uma dupla digestão utilizando as enzimas de restrição (*BamHI* e *HindIII*). Posteriormente, os fragmentos digeridos foram purificados do gel de agarose 1,5% em quantidades suficientes.

Da mesma forma que os vetores foram preparados, os plasmídeos contendo os genes das proteínas NS1 e NS3 também foram digeridos com as enzimas (*BamHI* e *HindIII*) para a liberação dos insertos com extremidades coesivas e as bandas que apresentaram o tamanho esperado foram purificadas do gel de agarose 1,5% em quantidades suficientes. E os produtos da digestão foram purificados do gel utilizando o kit *AxyPrep DNA Gel Extraction Kit* (Axygen, EUA). Os fragmentos obtidos foram ligados ao vetor de expressão utilizando uma T4 DNA ligase (Invitrogen, EUA). O produto da ligação foi utilizado para transformar células *E. coli* BL21 (DE3) quimicamente competentes. As colônias contendo o inserto esperado foram selecionadas e confirmadas como descrita anteriormente.

4.1.7 Indução e expressão das proteínas recombinantes

Uma colônia bacteriana para cada uma das proteínas NS1 e NS3, contendo os respectivos genes clonados, e uma colônia que expressa a proteína N do vírus Oropouche (OROV) também clonada com o plasmídeo pQE-30 para ser utilizada como controle positivo da expressão, foram transferidas para 10 mL de meio LB com ampicilina [50µg/mL], e crescidas *overnight* à 37°C.

Após o crescimento, 250 µL de cada cultura foram transferidos para 10 mL de meio LB novo contendo ampicilina [50µg/mL] e crescido por 2h à 37°C até que sua turbidez tenha atingido uma OD₆₀₀ de 0,5-0,7.

Para induzir a expressão, a essas novas culturas (exceto controles negativos) foi adicionado numa concentração final de 0,1mM o indutor sintético IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) que é análogo à lactose e não degradável o qual se associa ao repressor *Lac* inibindo-o, deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase e consequente transcrição do gene, seguindo de incubação por mais 4 horas a 37°C.

Após 4h foram coletadas alíquotas das culturas e estas centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, e o *pellet* foi ressuscitado em 200 µL de tampão SDS 1X. A lise celular foi feita por sonicação no aparelho *Dismembrator 100* (Fischer Scientific Sonic, EUA) a 200w por 5 vezes de 30 segundos com intervalo de 30 segundos. Para confirmar a presença da proteína purificada, 10µl de cada amostra foi submetido a um SDS-PAGE 12%, (110V constante por 1h).

Posteriormente as bandas foram coradas com *Coomassie blue* (0,25% de *Coomassie brilliant blues*; 45% metanol; 10% ácido acético) por 1h e descorada em solução descorante (30% de metanol e 10% de ácido acético) por 30 minutos (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

4.2 Confirmação da expressão das proteínas recombinantes por *Western blot*

4.2.1 Utilizando como anticorpo primário soro imune de camundongos

Para confirmação da expressão das proteínas recombinantes específicas do DENV-3, 10 µl da cultura bacteriana de expressão de cada proteína foi submetida a um SDS-PAGE 12%, (110V constante por 1h). Em seguida as bandas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, EUA) de 0,22 µm em cuba vertical com tampão de transferência (39mM de glicina, 48mM de Tris-base, 0,037% de SDS e 20% metanol) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A transferência eletroforética foi realizada utilizando 100V por 1h. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Pounceau (0,2% de Pounceau; 3% de ácido tricloroacético e 3% de ácido sulfosalicílico) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) por 10 minutos, seguido de lavagem com água destilada para remover o corante e a marcação da localização das bandas com grafite. Posteriormente, a membrana foi incubada com solução de bloqueio TBS (20mM de Tris-Cl, 500mM de NaCl e H₂O) à 5% de leite desnatado por 2h a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, foi lavada 3 vezes com TBS-Tween (20mM de Tris-Cl, 500mM de NaCl, 0,05% de Tween 20 e H₂O).

A marcação foi realizada utilizando anticorpos primários policlonais, do fluido ascítico imune de camundongos (*Mouse Immune Ascitic Fluid* - MIAF) obtidos a partir de camundongos infectados com os quatro sorotipos do vírus da dengue diluídos 1:1000 em TBS-Tween à 5% de leite desnatado e incubação por 1h a temperatura ambiente seguido por três lavagens com TBS-Tween 0,05% para remoção dos anticorpos que não se ligaram. Na sequência, as membranas foram incubadas por 1h em uma diluição 1:1000 com TBS-Tween à 5% de leite desnatado do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Chemicon) produzido em coelho conjugado com fosfatase alcalina (PA) (SIGMA-Aldrich, EUA). Posteriormente foi realizada a revelação com adição do substrato NBT/BCIP (SIGMA-Aldrich, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.2 Utilizando como anticorpo primário soro de pacientes com dengue

Após confirmadas, as proteínas NS1 e NS3 foram submetidas a um *Western blot* diretamente com soros de pacientes com dengue. Para isso, foi seguido o mesmo protocolo de *Western blot* citado anteriormente iniciado com a transferência eletroforética das proteínas NS1 e NS3 cada uma para uma membrana de nitrocelulose em poço horizontal único seguido de coloração com vermelho de *Pounceau* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Cada membrana foi cortada em diversas tiras, cada uma contendo uma pequena quantidade de cada proteína as quais foram incubadas com solução de bloqueio (TBS à 5% de leite desnatado) por 2h a temperatura ambiente sob agitação seguido de lavagens com TBS-Tween 0,05%, e em seguida incubadas por 1h à temperatura ambiente com soros de pacientes com dengue Tabela 2 ou controle como anticorpo primário, seguido de lavagens com TBS-Tween 0,05% para a remoção dos anticorpos que não se ligaram às proteínas.

Em seguida, cada tira da membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina (AP) (SIGMA-Aldrich, EUA) seguido de lavagens

com TBS-Tween 0,05%. Após estes procedimentos, foi realizada a revelação com a adição do substrato NBT/BCIP (SIGMA-Aldrich, EUA).

Tabela 2 - Soros de pacientes com dengue utilizados no *Western blot*.

Nº do paciente	IgM	IgG	NS1	RT-PCR
1	-	-	-	-
2	+	+	-	+
3	+	+	+	+
4	-	+	+	-
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	-	+

5 RESULTADOS

5.1 Amplificação e clonagem dos genes das proteínas NS1 e NS3

Os genes das proteínas NS1 e NS3 do DENV-3 cepa D3BR/RP1/2003 foram amplificados por RT-PCR. Os produtos resultantes da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e o resultado pode ser visualizado na figura 6. Observam-se *amplicons* com tamanhos aproximados de 1050 pb e 1850 pb correspondentes aos genes das proteínas NS1 e NS3, respectivamente.

Figura 6. Amplificação dos genes das proteínas NS1 e NS3 do DENV-3. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) Produto da PCR utilizando os *primers* para o gene da proteína NS1. **B)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) Produto da PCR utilizando os *primers* para o gene da proteína NS3.

Os *amplicons* obtidos foram recuperados do gel de agarose e submetidos novamente à eletroforese para confirmação da pureza (Figura 7).

Figura 7. Purificação do gel dos amplicons das proteínas NS1 e NS3. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) Amplicons do gene da proteína NS1. **B)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) Amplicons do gene da proteína NS3.

Os amplicons correspondentes aos genes das proteínas NS1 e NS3 foram ligados no vetor plasmidial pCR-XL-TOPO (Invitrogen, EUA) e os plasmídeos gerados foram utilizados para transformar células *E. coli* TOP 10. As colônias brancas, supostamente positivas, foram analisadas pela técnica da lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) que permite uma comparação de tamanho com um controle. A figura 8 mostra um gel de agarose contendo os plasmídeos obtidos de diferentes colônias brancas, sendo que vários plasmídeos apresentaram tamanho maior que o plasmídeo controle sem inserto sugerindo a correta ligação dos insertos ao vetor.

Figura 8. Análise das colônias brancas após transformação. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) e (15) pCR-XL-TOPO das colônias azuis; (2) ao (14) pCR-XL-NS1 das colônias brancas. **B)** (1) e (5) pCR-XL-TOPO das colônias azuis; (2) ao (4) pCR-XL-NS3 das colônias brancas.

Para confirmar a presença dos genes das proteínas NS1 e NS3, um plasmídeo correspondente a cada construção foi submetido a uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e o resultado pode ser observado na Figura 9.

Figura 9. Dupla digestão enzimática do vetor pCR-XL contendo os genes das proteínas NS1 e NS3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) pCR-XL-NS1 digerido com *Bam*HI e *Hind*III (2) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA). **B)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) pCR-XL-NS3 digerido com *Bam*HI e *Hind*III.

A digestão enzimática dos plasmídeos mostrou insertos de 1050 e 1850 pb, compatíveis com os genes das proteínas NS1 e NS3, respectivamente. Esses plasmídeos que apresentaram insertos com os tamanhos esperados após a digestão enzimática foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico, o que permitiu analisar a presença de possíveis mutações indesejadas.

5.2 Subclonagem dos genes das proteínas NS1 e NS3 no vetor de expressão pQE-30

Os genes das proteínas NS1 e NS3 contidos nos plasmídeos pCR-XL-NS1 e pCR-XL-NS3 foram obtidos por digestão com *Bam*HI e *Hind*III para clonagem no vetor de expressão pQE-30, o qual também foi digerido com *Bam*HI e *Hind*III (Figura 10).

Figura 10. Purificação dos insertos correspondentes aos genes das proteínas NS1 e NS3 após digestão com *Bam* HI e *Hind* III e do vetor de expressão pQE-30. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (INVITROGEN, EUA); (2) pQE-30 não digerido; (3) pQE-30 digerido com *Bam* HI e *Hind* III; (4) pCR-XL-NS1 não digerido; (5) NS1. **B)** (1) NS3; (2) pCR-XL-NS3 não digerido; (3) pQE-30 digerido com *Bam* HI e *Hind* III; (4) pQE-30 não digerido.

Os fragmentos codificadores das proteínas NS1 e NS3 do DENV com extremidades coesivas foram ligados ao vetor de expressão pQE-30 por reação com a enzima T4 DNA Ligase. Os plasmídeos recombinantes gerados foram utilizados para transformar células *E. coli* da cepa M15 quimicamente competentes.

Depois de obtidas colônias isoladas, várias delas foram submetidas a um *screening* para identificação dos plasmídeos contendo inserto pela técnica de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) (Figura 11).

Figura 11. Screening das colônias após transformação com os plasmídeos de expressão. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) pQE-30; (2) ao (5) pQE-30-NS1. **B)** (1) pQE-30; (2) ao (5) pQE-30-NS3.

Os plasmídeos que apresentaram insertos com os tamanhos esperados foram confirmados quanto a presença dos insertos por digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III após a digestão foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico, o que permitiu comprovar que estes continham os insertos correspondentes aos genes das proteínas NS1 e NS3 na orientação correta e sem mutações indesejadas.

5.3 Indução e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 em *E. coli* M15.

Após a confirmação da presença dos genes das proteínas NS1 e NS3 nos plasmídeos por digestão enzimática e sequenciamento nucleotídico, as colônias foram crescidas em meio LB com antibiótico apropriado e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com IPTG. Alíquotas coletadas após 1, 2, 3 e 4h de indução foram analisadas sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 12%.

A Figura 12 mostra que as proteínas das colônias induzidas apresentam um padrão de migração similar às colônias não induzidas, indicando que não houve expressão das proteínas recombinantes.

Figura 12. Expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do DENV-3. Eletroforese SDS-PAGE 12% corado com *comassie blue* e visualizado em transiluminador de luz branca. **A)** (1) *E. coli* M15 não induzida, (2) Controle de expressão (proteína N de OROV); (3) ao (6) *E. coli* M15 contendo pQE-30-NS1 após 1, 2, 3 e 4h de indução. **B)** (1) *E. coli* M15 não induzida, (2) Controle de expressão (proteína N de OROV); (3) ao (6) *E. coli* M15 contendo pQE-30-NS3 após 1, 2, 3 e 4h de indução.

Após verificada a não expressão das proteínas NS1 e NS3 nas células M15, os plasmídeos foram purificados utilizando o kit *Qiagen Plasmid Mini Kit* (QIAGEN, EUA) para eliminação de proteínas e RNA contaminantes (Figura 13) e estes foram então utilizados na transformação de outra cepa de *E. coli*.

Figura 13. Purificação do plasmídeo pQ30 contendo os genes das proteínas NS1 e NS3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) pQE-30; (2) ao (4) pQE-30-NS1. **B)** (1) pQE-30; (2) e (3) pQE-30-NS3.

5.4 Transformação de células *E. coli* BL21(DE3)

Não foi possível expressar as proteínas NS1 e NS3 na estratégia inicial utilizando a cepa de *E. coli* M15, sugerindo que estas células não seriam apropriadas para a expressão destas proteínas. Desta maneira, os plasmídeos purificados das células M15 foram utilizados para transformar células *E. coli* BL21(DE3) a qual é bastante conhecida devido a sua capacidade de expressão de proteínas recombinantes em altas quantidades.

Após o crescimento de colônias isoladas, várias delas foram submetidas a um *screening* para identificação das colônias contendo os plasmídeos pQE-30-NS1 e pQE-30-NS3 pela técnica de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) (Figura 14).

Figura 14. Screening das colônias após transformação com os plasmídeos de expressão. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. **A)** (1) e (11) pQE-30; (2) ao (10) pQE-30-NS1. **B)** (1) e (7) pQE-30; (2) ao (6) pQE-30-NS3.

5.5 Indução e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 em *E. coli* BL21(DE3).

Uma colônia de cada célula BL21(DE3) transformada com os plasmídeos pQE-30-NS1 e pQE-30-NS3, foi cultivada em meio LB com antibiótico apropriado e induzida a expressão das proteínas recombinantes com IPTG. Alíquotas coletadas após 4h de indução foram analisadas sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 12% (Figura 15).

Figura 15. Expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do DENV-3. Eletroforese SDS-PAGE 12% corado com *comassie blue* e visualizado em transiluminador de luz branca. **A)** (1) BL21(DE3) pQE-30-NS1 não induzido; (2) BL21(DE3) pQE-30-NS1 induzido; (3) BL21(DE3) pQE-30-NS3 não induzido; (4) BL21(DE3) pQE-30-NS3 induzido; (5) Marcador (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen, EUA). **B)** Controle positivo de indução da expressão. (1) BL21(DE3) pQE-30-N (OROV) não induzido; (2) BL21(DE3) pQE-30-N (OROV) induzido.

Através da eletroforese foi possível observar a expressão de duas proteínas com tamanhos aproximados de 45 e 70 kDa, coerentes com o tamanho esperado para as proteínas NS1 e NS3, respectivamente.

5.6 Confirmação da expressão das proteínas recombinantes por *Western blot*

5.6.1 Utilizando como anticorpo primário soro imune de camundongos

As proteínas recombinantes foram primeiramente confirmadas por *Western blot* utilizando como anticorpo primário fluido ascítico imune de camundongos (*Mouse Immune Ascitic Fluid* - MIAF) obtidos a partir de camundongos infectados com DENV-1, -2, -3 e -4. Como controle da expressão foi utilizado uma colônia bacteriana da cepa BL21(DE3) que contém o plasmídeo pGS21a/GST, a qual expressa a proteína GST de 28 kDa. A figura 16 B mostra o reconhecimento pelos anticorpos de proteínas com tamanho de 45 e 70 kDa

correspondente às bandas das proteínas recombinantes NS1 e NS3, respectivamente, confirmando a expressão das proteínas.

Duas proteínas de menor peso molecular também foram reconhecidas pelo anticorpo policlonal na coluna contendo a proteína NS3, sugerindo que a proteína poderia estar sendo alvo de proteases celulares o que resultaria no surgimento de fragmentos proteicos menores que foram detectados nos testes de *Western blot*.

Figura 16. Western blot das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do DENV-3. A) Eletroforese SDS-PAGE 12% corado com *comassie blue* e visualizado em transiluminador de luz branca. 1) Marcador (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen, EUA); (2) NS1; (3) NS3; (4) controle negativo não induzido; (5) pGS21a/GST. B) Western blot.

5.6.2 Utilizando como anticorpo primário soro de pacientes com dengue

A análise da expressão das proteínas recombinantes foi realizada por *Western blot* utilizando também como anticorpo primário soro de sete pacientes infectados pelo vírus da dengue. A Figura 17 B mostra que a proteína NS1 foi reconhecida pelo MIAF e por um dos soros de pacientes (soro 4) enquanto que a proteína NS3 foi reconhecida apenas pelo MIAF e não pelos soros de pacientes (Figura 18 B).

Figura 17. Expressão e imunodetecção da proteína NS1 de DENV-3. **A)** Gel de poliacrilamida: (1) Marcador de peso molecular (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen, EUA), (2) BL21(DE3) pQE-30/NS1 não induzida, (3) BL21(DE3) pQE-30/NS1 induzida. **B)** *Western blot* de BL21(DE3) pQE-30/NS1 induzida e analisada com (1) soro de indivíduo sadio, (2) Pool de soros de pacientes com dengue, (3) MIAF DENV, (4) soro de camundongo não imune, (5) ao (10) soros de pacientes com dengue indicados na Tabela 2 [(5) soro 2, (6) soro 3, (7) soro 4, (8) soro 5, (9) soro 6, (10) soro 7].

Figura 18. Expressão e imunodetecção da proteína NS3 de DENV-3. **A)** Gel de poliacrilamida: (1) Marcador de peso molecular (BenchMark Protein Ladder - Invitrogen), (2) BL21(DE3) pQE-30/NS3 não induzida, (3) BL21(DE3) pQE-30/NS3 induzida. **B)** *Western blot* de BL21(DE3) pQE-30/NS1 induzida e analisada com: (1) soro 1 de indivíduo sadio, (2) Pool de soros de pacientes com dengue, (3) MIAF DENV, (4) soro de camundongo não imune, (5) ao (10) soros de pacientes com dengue indicados na Tabela 2 [(5) soro 2, (6) soro 3, (7) soro 4, (8) soro 5, (9) soro 6, (10) soro 7].

Os resultados obtidos com o *Western blot* utilizando como anticorpo primário soro imune de camundongos ou soro de pacientes com dengue, no caso da proteína NS1, confirmam a expressão das proteínas NS1 e NS3 do DENV-3.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo expressar as proteínas não estruturais NS1 e NS3 do vírus da dengue sorotipo 3 em sistema que utiliza vetores plasmídiais de expressão procariótica.

As proteínas recombinantes foram expressas quando utilizada a cepa de *E. coli* BL21(DE3), a qual apresenta baixos níveis de produção de proteases que poderiam degradar a proteína de interesse e permite altos níveis de expressão de proteínas recombinantes (STUDIER et al., 1990).

Outros autores também utilizaram esta cepa de *E. coli* com sucesso para expressão destas mesmas proteínas do vírus da dengue, como, por exemplo, LI, H. et al. (1999) que utilizaram a BL21(DE3) para expressar a proteína NS3 do DENV-2 assim como Huang e colaboradores (2001) demonstrando com sucesso a expressão da proteína NS1 do DENV-2 também nesta cepa.

A confirmação da expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blot* utilizando fluido imune ascítico de camundongos e soro de pacientes com dengue. Na eletroforese, foi possível constatar a indução da expressão de proteínas com tamanhos condizentes aos das proteínas NS1 (45 kDa) e NS3 (70 kDa); enquanto que, no *Western blot* confirmou-se a expressão correta das proteínas, já que houve reconhecimento das mesmas por anticorpos policlonais contra DENV.

A expressão das proteínas NS1 e NS3 do DENV também foi obtida por outros autores em condições similares às apresentadas neste trabalho, utilizando também um sistema de expressão procarioto e confirmação por SDS-PAGE e *Western blot* (AMORIM et al., 2010; ATHMARAM et al., 2012; BARTELMA; PADMANABHAN, 2002; DAS; MONGKOLAUNGKON; SURESH, 2009; HUANG et al., 2006; TIAN et al., 2006).

A análise da expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 por *Western blot* revelou a presença de outras bandas com tamanhos menores. No caso da proteína NS1 foi observado no gel de poliacrilamida, a presença de pelo menos duas bandas de tamanhos aproximados de 28 e 32 kDa, as quais também foram reconhecidos no *Western blot*. AMORIM et al. (2010), também observaram essas proteínas de menor tamanho em seu trabalho durante a expressão da proteína NS1 do DENV-2, e sugeriram que poderiam representar artefatos gerados pelo comportamento eletroforético anômalo desta proteína.

Esta hipótese é pouco provável uma vez que é possível observar duas bandas de tamanho distinto.

Várias hipóteses podem ser aventadas para tentar elucidar o surgimento desses fragmentos menores; poderiam ser resultado de uma clivagem da proteína NS1 por proteases bacterianas ou por uma atividade autocatalítica desta proteína, ou a terminação prematura da tradução desta proteína devido à utilização de códons pouco frequentes na bactéria BL21(DE3). DAS et al. (2009) expressaram a proteína NS1 de DENV-1 após a otimização dos códons para expressão em sistema procariótico obtendo um perfil de expressão similar ao nosso, sugerindo que a presença de fragmentos de tamanho menor não se deve a utilização de códons pouco frequentes.

ATHMARAM et al. (2012) expressaram a proteína NS1 obtendo uma única proteína de tamanho de 46 kDa sem os produtos de menor tamanho, porém estes autores utilizaram uma cepa diferente de *E. coli* (Rosetta-gami) daquela utilizada no presente trabalho, sugerindo que proteases bacterianas presentes na cepa BL21(DE3) poderiam ser responsáveis pela clivagem da proteína NS1 de DENV-3. Por outro lado, a presença de produtos menores poderia ocorrer também devido a uma atividade autocatalítica da proteína NS1, entretanto esta atividade não apresenta descrição na literatura.

No caso da proteína NS3, além do fragmento de 70 kDa correspondente à proteína inteira, foram observadas proteínas com tamanhos menores de ≈ 20 e ≈ 40 kDa. Estes fragmentos de tamanhos menores poderiam ser resultantes da autocatalise sofrida pela proteína NS3, já que o domínio protease da NS3 cliva a própria proteína na porção C-terminal do domínio helicase gerando dois fragmentos proteicos de ≈ 20 e ≈ 50 kDa (Figura 19) similar ao observado na figura 16-B.

Figura 19. Sítios de clivagem interna da proteína NS3. Modificado de (BERA; KUHN; SMITH, 2007).

A expressão heteróloga do domínio protease da proteína NS3 ou da proteína inteira tende a formar agregados resultando em uma proteína sem função protease devido à necessidade da porção hidrofílica central da proteína NS2B para formar a protease ativa (ARIAS; PREUGSCHAT; STRAUSS, 1993; COSTA et al., 2011; FALGOUT; MILLER; LAI, 1993; FALGOUT et al., 1991; LEUNG, D. et al., 2001; LI, H. et al., 1999; LI, J. et al., 2005; YUSOF et al., 2000).

Proteínas de tamanhos menores também foram observadas durante a expressão de NS3 por outros autores. Por exemplo, LI, H. et al. (1999), utilizaram a mesma célula *E. coli* BL21(DE3) utilizada no trabalho para expressão da proteína NS3 de DENV-2 observando duas proteínas de tamanhos menores mas diferente das observadas em nosso trabalho. Por outro lado, TIAN et al. (2006) expressaram a proteína NS3 do DENV-2 em células *E. coli* cepa JM109 e observaram quatro produtos proteicos de menor tamanho, entre 50 e 60 kDa. dados que também foram observados no trabalho de CHEN, K. X. et al. (2008) o qual utilizou as mesmas condições.

Quando utilizado o sistema eucariótico para expressão da proteína NS3, também são observadas proteínas de tamanhos menores que aquela correspondente à proteína inteira, mas com perfil diferente daquelas observadas em sistemas procarióticos (COSTA et al., 2011). Estes dados sugerem que a expressão heteróloga da proteína NS3 poderia estar sendo alvo de proteases celulares resultando no aparecimento de fragmentos proteicos de menor tamanho detectados nos testes de *Western blot*.

A correta expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 de DENV-3 foi determinada por *Western blot* utilizando como anticorpo primário um pool de líquido imune ascítico de camundongo imunizado com os quatro sorotipos virais. As proteínas foram também avaliadas quanto a sua capacidade de serem reconhecidas por soro de pacientes com dengue, no entanto apenas a proteína NS1 foi detectada para um dos seis soros utilizados. Os outros cinco soros não detectaram nenhuma das proteínas possivelmente por serem provenientes de pacientes na fase aguda da doença, quando é possível detectar o genoma viral por RT-PCR em tempo real e NS1 circulante (Tabela 2).

Outra possibilidade seria que estes pacientes tivessem sido infectados com outros sorotipos do vírus da dengue e não o sorotipo 3, já que estes pacientes não tiveram o sorotipo infectante determinado. As amostras de soro utilizadas foram coletadas no período de 20/06/10 à 26/04/11, o qual coincide com a circulação predominante do sorotipo 1 do DENV

durante a última epidemia registrada, a qual também houve circulação dos DENV-2 e -3 (MS/SVS, 2010; PRETO, 2011).

O soro do paciente 4 (Tabela 2) foi capaz de detectar a proteína NS1, mas não a NS3; este achado poderia ser devido ao fato de que a proteína NS1 é secretada pela células infectadas e circula no sangue dos pacientes na fase aguda induzindo uma forte resposta humoral (LINDENBACH, B. D; et al., 2007).

Por outro lado, a proteína NS3 desencadeia uma forte resposta imune celular e uma fraca resposta humoral, o que poderia explicar a ausência de detecção pelo soro do paciente número 4 (BRINTON et al., 1998; LAZARO-OLAN et al., 2008; MATHEW; ROTHMAN, 2008; ROTHMAN, 2004).

A proteína NS1 é uma glicoproteína que apresenta regiões altamente conservadas entre os quatro sorotipos virais (MASRINOUL et al., 2011). Nesse sentido, esta proteína apresenta um potencial para ser utilizada como antígeno na detecção de anticorpos no soro de pacientes infectados com o DENV. Além disso, a proteína NS1 poderia ser utilizada para preparação de anticorpos monoclonais a serem utilizados em métodos de diagnóstico baseados na detecção da proteína NS1 durante a fase aguda da doença, como é o caso de kits comerciais já existentes - Platelia Dengue NS1 ELISA Ag (Bio-Rad), Dengue NS1 Ag Strip (Bio-Rad), Dengue Early ELISA (Panbio) e Dengue Duo Test (Bioeasy). Por outro lado, sabe-se que a proteína NS1 induz proteção imune em modelo animal o que poderia ser explorado para a produção de uma vacina eficiente contra a dengue.

A proteína NS3 é uma proteína conservada entre os quatro sorotipos do vírus da dengue e possui epítomos de células T em seu interior, alvo principal para células T CD4+ e CD8+ de resposta de células T (APPANNA et al., 2007; MATHEW; ROTHMAN, 2008) além de induzir uma resposta protetora em camundongos quando utilizada como uma vacina de DNA (COSTA et al., 2011) esses dados demonstram a potencial utilização da proteína NS3 como um complemento para uma vacina contra a doença, por exemplo, em conjunto com o domínio 3 da proteína E do envelope viral ou a NS1, os quais são capazes de gerar forte resposta humoral.

Os dois plasmídeos recombinantes obtidos neste trabalho pQE-30/NS1 e pQE-30/NS3 são poderosas ferramentas, as quais poderão ser utilizadas na pesquisa básica. Estas construções poderão ser utilizadas para o entendimento da função das proteínas NS1 e NS3 na patogênese da doença através do uso de mutações sitio dirigida. Além disso, estas construções poderão ser utilizadas no entendimento dos mecanismos de replicação viral.

7 CONCLUSÕES

- ✓ As proteínas recombinantes NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3 foram expressas em bactérias *Escherichia coli* cepa BL21(DE3).
- ✓ As proteínas recombinantes NS1 e NS3 mostraram-se positivas por *Western blot* quando utilizado anticorpos policlonais de camundongos infectados com os quatro sorotipos virais, confirmando a sororeatividade.
- ✓ A proteína NS1 foi detectada por um soro de paciente com dengue, confirmando seu potencial como antígeno em métodos de diagnóstico sorológico ou na preparação de anticorpos monoclonais para desenvolvimento de um método para detecção da proteína NS1.
- ✓ A proteína NS3 não foi detectada por soro de pacientes com dengue, mostrando pouco potencial para sua utilização em métodos de diagnóstico sorológico.

8 REFERÊNCIAS

- ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 376-81, Feb 2002.
- AMORIM, J. H. et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **J Virol Methods**, v. 167, n. 2, p. 186-92, Aug 2010.
- ANANDARAO, R. et al. Recombinant multiepitope protein for early detection of dengue infections. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 1, p. 59-67, Jan 2006.
- ANDERSON, R.; KING, A. D.; INNIS, B. L. Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. **J Gen Virol**, v. 73 (Pt 8), p. 2155-9, Aug 1992.
- APPANNA, R. et al. Cross-reactive T-cell responses to the nonstructural regions of dengue viruses among dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Malaysia. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 8, p. 969-77, Aug 2007.
- AQUINO, V. H. et al. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 4, p. 710-5, Oct 2006.
- ARIAS, C. F.; PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, J. H. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. **Virology**, v. 193, n. 2, p. 888-99, Apr 1993.
- ASSENBERG, R. et al. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. **J Virol**, v. 83, n. 24, p. 12895-906, Dec 2009.
- ATHMARAM, T. N. et al. Optimization of Dengue-3 recombinant NS1 protein expression in *E. coli* and in vitro refolding for diagnostic applications. **Virus Genes**, Nov 28 2012.
- AVIRUTNAN, P. et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis**, v. 193, n. 8, p. 1078-88, Apr 15 2006.
- AVIRUTNAN, P. et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 11, p. e183, Nov 2007.
- BARBA-SPAETH, G. et al. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. **J Exp Med**, v. 202, n. 9, p. 1179-84, Nov 7 2005.

BARTELMA, G.; PADMANABHAN, R. Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. **Virology**, v. 299, n. 1, p. 122-32, Jul 20 2002.

BEASLEY, D. W.; AASKOV, J. G. Epitopes on the dengue 1 virus envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal antibodies. **Virology**, v. 279, n. 2, p. 447-58, Jan 20 2001.

BERA, A. K.; KUHN, R. J.; SMITH, J. L. Functional characterization of cis and trans activity of the Flavivirus NS2B-NS3 protease. **J Biol Chem**, v. 282, n. 17, p. 12883-92, Apr 27 2007.

BRINTON, M. A. et al. Immune mediated and inherited defences against flaviviruses. **Clin Diagn Virol**, v. 10, n. 2-3, p. 129-39, Jul 15 1998.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol**, v. 44, p. 649-88, 1990.

CHAMBERS, T. J.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. **Virology**, v. 169, n. 1, p. 100-9, Mar 1989.

CHAMBERS, T. J. et al. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 22, p. 8898-902, Nov 1990.

CHEN, K. X. et al. Potent and selective small molecule NS3 serine protease inhibitors of Hepatitis C virus with dichlorocyclopropylproline as P2 residue. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 4, p. 1874-83, Feb 15 2008.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nat Med**, v. 3, n. 8, p. 866-71, Aug 1997.

CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; MARKS, R. M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **J Virol**, v. 70, n. 12, p. 8765-72, Dec 1996.

COSTA, S. M. et al. Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25685, 2011.

CRILL, W. D.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **J Virol**, v. 75, n. 16, p. 7769-73, Aug 2001.

DAMONTE, E. B.; PUJOL, C. A.; COTO, C. E. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. **Adv Virus Res**, v. 63, p. 239-85, 2004.

DAS, D.; MONGKOLAUNGKON, S.; SURESH, M. R. Super induction of dengue virus NS1 protein in E. coli. **Protein Expr Purif**, v. 66, n. 1, p. 66-72, Jul 2009.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Braz J Infect Dis**, v. 8, n. 6, p. 390-8, Dec 2004.

EFFLER, P. V. et al. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 5, p. 742-9, May 2005.

ELENA, S. F. et al. Genomic divergence of Escherichia coli strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. **Int Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 271-8, Dec 2005.

FALGOUT, B.; MILLER, R. H.; LAI, C. J. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. **J Virol**, v. 67, n. 4, p. 2034-42, Apr 1993.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **J Virol**, v. 65, n. 5, p. 2467-75, May 1991.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318-28, Apr 23 2009.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 480-96, Jul 1998.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 100-3, Feb 2002.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerg Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 55-7, Apr-Jun 1995.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, n. 6, p. 621-7, Nov 1996.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **J Clin Virol**, v. 27, n. 1, p. 1-13, May 2003.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int J Infect Dis**, v. 8, n. 2, p. 69-80, Mar 2004.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G.; HALSTEAD, S. B. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? **Lancet**, v. 355, n. 9218, p. 1902-3, May 27 2000.

GUZMAN, M. G. et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. **Am J Epidemiol**, v. 152, n. 9, p. 793-9; discussion 804, Nov 1 2000.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **Yale J Biol Med**, v. 42, n. 5, p. 350-62, Apr 1970.

HALSTEAD, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. **Annu Rev Entomol**, v. 53, p. 273-91, 2008.

HE, R. T. et al. Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. **J Med Virol**, v. 45, n. 4, p. 451-61, Apr 1995.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **J Clin Virol**, v. 55, n. 4, p. 289-95, Dec 2012.

HUANG, K. J. et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **J Immunol**, v. 176, n. 5, p. 2825-32, Mar 1 2006.

KAMIONKA, M. Engineering of therapeutic proteins production in Escherichia coli. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, n. 2, p. 268-74, Feb 1 2011.

KEELAPANG, P. et al. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. **J Virol**, v. 78, n. 5, p. 2367-81, Mar 2004.

KIMURA, R.; HOTTA, S. On the inoculation of dengue virus into mice. **Nippon Igaku**, v. 3379, p. 629-633, 1944.

KITTIGUL, L. et al. Comparison of dengue virus antigens in sera and peripheral blood mononuclear cells from dengue infected patients. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 15, n. 4, p. 187-91, Dec 1997.

KOURI, G. et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. **Emerg Infect Dis**, v. 4, n. 1, p. 89-92, Jan-Mar 1998.

KOURI, G. P. et al. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bull World Health Organ**, v. 67, n. 4, p. 375-80, 1989.

KROSCHEWSKI, H. et al. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. **Virology**, v. 308, n. 1, p. 92-100, Mar 30 2003.

KROSCHEWSKI, H. et al. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain. **J Biol Chem**, v. 283, n. 28, p. 19410-21, Jul 11 2008.

KUMMERER, B. M.; RICE, C. M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **J Virol**, v. 76, n. 10, p. 4773-84, May 2002.

LAZARO-OLAN, L. et al. Analysis of antibody response in human dengue patients from the Mexican coast using recombinant antigens. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 8, n. 1, p. 69-79, Spring 2008.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **J Virol**, v. 73, n. 6, p. 4738-47, Jun 1999.

LEUNG, D. et al. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. **J Biol Chem**, v. 276, n. 49, p. 45762-71, Dec 7 2001.

LEUNG, J. Y. et al. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **J Virol**, v. 82, n. 10, p. 4731-41, May 2008.

LI, H. et al. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. **J Virol**, v. 73, n. 4, p. 3108-16, Apr 1999.

LI, J. et al. Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. **J Biol Chem**, v. 280, n. 31, p. 28766-74, Aug 5 2005.

LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, v. 186, n. 8, p. 1165-8, Oct 15 2002.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. **J Virol**, v. 71, n. 12, p. 9608-17, Dec 1997.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; CHARLES M. RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: WILKINS, L. W. (Ed.). **Fields Virology**. 5th, v.II, 2007. cap. 33, p.1102-1152.

LIU, W. J.; CHEN, H. B.; KHROMYKH, A. A. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. **J Virol**, v. 77, n. 14, p. 7804-13, Jul 2003.

LIU, W. J. et al. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. **J Virol**, v. 78, n. 22, p. 12225-35, Nov 2004.

LOBIGS, M. Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 13, p. 6218-22, Jul 1 1993.

LOZACH, P. Y. et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **J Biol Chem**, v. 280, n. 25, p. 23698-708, Jun 24 2005.

LUO, D. et al. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. **J Virol**, v. 82, n. 1, p. 173-83, Jan 2008.

MA, L. et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **PNAS**. 101: 3414-3419 p. 2004.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 6, p. 1292-305, Mar 15 2002.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, n. 1, p. 232-40, Jun 1 1996.

MACKENZIE, J. M. et al. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. **Virology**, v. 245, n. 2, p. 203-15, Jun 5 1998.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. 2010.

MALAVIGE, G. N. et al. Dengue viral infections. **Postgrad Med J**, v. 80, n. 948, p. 588-601, Oct 2004.

MARTINEZ TORRES, E. [Preventing deaths from dengue: a space and challenge for primary health care]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 20, n. 1, p. 60-74, Jul 2006.

MASRINOUL, P. et al. Highly conserved region 141168 of the NS1 protein is a new common epitope region of dengue virus. **Jpn J Infect Dis**, v. 64, n. 2, p. 109-15, 2011.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunol Rev**, v. 225, p. 300-13, Oct 2008.

MILLER, S. et al. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **J Biol Chem**, v. 282, n. 12, p. 8873-82, Mar 23 2007.

MILLER, S.; SPARACIO, S.; BARTENSCHLAGER, R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. **J Biol Chem**, v. 281, n. 13, p. 8854-63, Mar 31 2006.

MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-9, Jan 22 2004.

MODIS, Y. et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **J Virol**, v. 79, n. 2, p. 1223-31, Jan 2005.

MS/SVS. Informe Epidemiológico da Dengue: Análise de situação e tendências - 2010. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. 2010.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 1, p. 13-22, Jan 2005.

MUYLAERT, I. R.; GALLER, R.; RICE, C. M. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. **J Virol**, v. 71, n. 1, p. 291-8, Jan 1997.

NIESTERS, H. G. Clinical virology in real time. **J Clin Virol**, v. 25 Suppl 3, p. S3-12, Dec 2002.

- OISHI, K. et al. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. **J Infect Chemother**, v. 13, n. 3, p. 125-33, Jun 2007.
- PAROUTIS, P.; TOURET, N.; GRINSTEIN, S. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. **Physiology (Bethesda)**, v. 19, p. 207-15, Aug 2004.
- PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Res**, v. 80, n. 1, p. 11-22, Oct 2008.
- PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 369-77, Aug 2008.
- PERICH, M. J. et al. Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. **J Med Entomol**, v. 37, n. 4, p. 541-6, Jul 2000.
- PREFEITURA MUNICIPAL DE PRETO. **Balanco Dengue - Janeiro a Junho de 2011**. Secretaria Municipal de Saúde. 2011.
- RICE, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 726-33, Aug 23 1985.
- RIGAU-PEREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971-7, Sep 19 1998.
- RODRIGUEZ-ROCHE, R. et al. Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. **Virology**, v. 334, n. 2, p. 154-9, Apr 10 2005.
- ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **J Clin Invest**, v. 113, n. 7, p. 946-51, Apr 2004.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning A Laboratory Manual**. 3th. 2001.
- SILER, J. F.; HALL, M. W.; KITCHENS, A. P. Dengue: Its History, Epidemiology, Mechanism of Transmission, Etiology, Clinical Manifestations, Immunity and Prevention. **Philippine Bur. J. Sci.**, v. 29, p. 301-304, 1926.
- STODDARD, S. T. et al. House-to-house human movement drives dengue virus transmission. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Dec 31 2012.
- STOHLMAN, S. A. et al. Dengue virus-induced modifications of host cell membranes. **J Virol**, v. 16, n. 4, p. 1017-26, Oct 1975.
- STUDIER, F. W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol**, v. 185, p. 60-89, 1990.
- THAVARA, U. et al. Larval occurrence, oviposition behavior and biting activity of potential mosquito vectors of dengue on Samui Island, Thailand. **J Vector Ecol**, v. 26, n. 2, p. 172-80, Dec 2001.

TIAN, Y. et al. Expression, purification of DENV-2 nonstructural protein 3 and production of the polyclonal antibody for NS3. **Dengue Bulletin**, v. 30, 2006.

WESTAWAY, E. G. et al. Flaviviridae. **Intervirology**, v. 24, n. 4, p. 183-92, 1985.

WESTAWAY, E. G.; GOODMAN, M. R. Variation in distribution of the three flavivirus-specified glycoproteins detected by immunofluorescence in infected Vero cells. **Arch Virol**, v. 94, n. 3-4, p. 215-28, 1987.

WHO. World Health Organization. 2012. Disponível em: <
<http://www.who.int/denguecontrol/en/>>.

WILDER-SMITH, A. Dengue infections in travellers. **Paediatr Int Child Health**, v. 32 Suppl 1, p. 28-32, May 2012.

WILSON, M. E. The traveller and emerging infections: sentinel, courier, transmitter. **J Appl Microbiol**, v. 94 Suppl, p. 1S-11S, 2003.

XU, H. et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2872-8, Aug 2006.

YAP, T. L. et al. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. **J Virol**, v. 81, n. 9, p. 4753-65, May 2007.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 3, p. 1053-7, Mar 2000.

YUSOF, R. et al. Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro. **J Biol Chem**, v. 275, n. 14, p. 9963-9, Apr 7 2000.

ZHANG, Y. et al. Structures of immature flavivirus particles. **EMBO J**, v. 22, n. 11, p. 2604-13, Jun 2 2003.

ZHANG, Y. et al. Structure of immature West Nile virus. **J Virol**, v. 81, n. 11, p. 6141-5, Jun 2007.