

# UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS  
GENÔMICAS E BIOTECNOLOGIA

## Mestrado

**Seqüenciamento do genoma completo do *Dengue vírus*  
sorotipo 1 do DF e expressão de proteínas virais ME  
em *Pichia pastoris*.**

Autora: Leticia Silva Fagundes

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

BRASÍLIA

2005

**LETÍCIA SILVA FAGUNDES**

**Seqüenciamento do genoma completo do  
*Dengue vírus* sorotipo 1 do DF e expressão de  
proteínas virais ME em *Pichia pastoris***

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação “*Stricto Sensu*” em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.”

**Orientador: Dr. Tatsuya Nagata**

Brasília  
2005

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

Dissertação defendida e aprovada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, defendida e aprovada, em 26 de agosto de 2005, pela banca examinadora constituída por:

---

Professor Dr. Bergmann Moraes Ribeiro  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília  
Examinador Externo

---

Professora Dra. Eliane Ferreira Noronha  
Universidade Católica de Brasília  
Examinadora Interna

---

Professor Dr. Tatsuya Nagata  
Universidade Católica de Brasília  
Orientador

Brasília  
UCB

Dedico à meu pai L. M. Fagundes, minha mãe Maria José S. M. Fagundes e à minha irmã Irene S. Fagundes pelo amor, apoio e incentivo.

Ofereço à Deus e Nossa Senhora pelo estímulo e perseverança nos momentos difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao Professor Dr. Tatsuya Nagata pela orientação, formação molecular, amizade, estímulo e pela idealização deste trabalho;
- Ao Professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres pela orientação;
- A Professora Dra. Eliane Ferreira Noronha, pelo auxílio, amizade, estímulo meu sincero obrigada;
- Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, pelo aprimoramento da minha formação acadêmica;
- A Dra. Alice Nagata pelo auxílio, estímulo e correção ortográfica deste trabalho;
- Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, Idacuy Mundim, Alessandra Reis, André Luiz Ramos, Márcia Araújo e Willian Baião Reis pela agradável convivência e auxílio;
- A todos os funcionários da UCB, em especial a Francisco Fabio Gomes da Costa (Fabinho) e Danielle Cordeiro, pela presteza;
- Ao amigo, namorado e irmão Marcio Alves Cabral pelo apoio, estímulo e carinho em todos os momentos do curso, sejam eles de vitória ou difíceis e decisivos;
- Às amigas Luciana Retori, Sandra Elisa Carvalho, Luciana Tagliaferro e em especial à Suzana Neiva Santos, pelas alegrias, carinho, companheirismo, convivência e pelas ProTeHomicas;
- A amiga Sandra Elisa Carvalho pelo apoio, motivação e amizade, meu sincero obrigada;

- Às amigas inesquecíveis Camila Chaves pelo apoio nas análises e companheirismo e Thaís T. C. e Souza, para as duas agradeço pela paciência, amizade, auxílio e presença, pelos momentos de descontração e carinho;
- Aos colegas de turma do mestrado pelos bons momentos em sala de aula e alegria nas reuniões ao longo do curso;
- Às colegas estagiárias Clarissa P. da Costa Gomes, Luisa Dutra e Priscila Amorim, pela imensa colaboração;
- Às minhas "filhas" Kelly Cristina, Brenda, Jessy e Mel pelos momentos de ternura e compreensão durante a caminhada do curso;
- À todos que contribuíram de alguma forma para o êxito deste trabalho.

“No fim, tudo dá certo. Se não deu,  
é porque ainda não chegou ao fim”.

Fernando Sabino

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| LISTA DE TABELAS.....  | X    |
| LISTA DE FIGURAS.....  | XI   |
| LISTA DE ABREVIACOES E SIMBOLOS.....                            | XII  |
| 1.RESUMO .....   | XIII |
| 2.ABSTRACT .....   | XIV  |
| 3.INTRODUÇÃO .....   | 1    |
| 3.1.Febre clássica, febre hemorrágica e choque do Dengue.....    | 2    |
| 3.2.Dengue: Ocorrência e distribuição geográfica.....            | 4    |
| 3.3.Dengue no Brasil: Histórico.....                             | 6    |
| 3.4.Etiologia.....   | 8    |
| 3.4.1.O agente transmissor/vetor.....                            | 8    |
| 3.4.2.Transmissão do DENV.....                                   | 9    |
| 3.4.3.Controle, tratamento e diagnóstico.....                    | 10   |
| 3.5.DENV: Classificação, morfologia e organização do genoma..... | 12   |
| 3.5.1.Família <i>Flaviviridae</i> .....                          | 12   |
| 3.5.2.O genoma viral.....  | 13   |
| 3.6.Epidemiologia Molecular.....                                 | 16   |
| 3.7.Proteínas do DENV na infecção.....                           | 18   |
| 3.7.1.Proteína E.....  | 18   |
| 3.8.Expressão em <i>P. Pastoris</i> .....                        | 20   |
| 4.OBJETIVO.....  | 21   |
| 5.MATERIAL E MÉTODOS.....  | 22   |
| 5.1.Material.....  | 22   |
| 5.1.1.Soluções Estoque.....                                      | 22   |
| 5.1.1.1.10X YNB.....   | 22   |
| 5.1.1.2.500X Biotina (0,002%).....                               | 22   |
| 5.1.1.3.100 Histidina (0,4%).....                                | 22   |
| 5.1.1.4.10X Dextrose (20%).....                                  | 23   |
| 5.1.1.5.10X Metanol (5%).....                                    | 23   |
| 5.1.1.6.Sorbitol 1M.....   | 23   |
| 5.1.1.7.PBS 10X (Phosphate-buffered saline).....                 | 23   |
| 5.1.1.8.PBS-T (Washing).....                                     | 24   |

|   |                |
|---|----------------|
| 5.1.1.9.Solução de Bloqueio.....  | 24             |
| 5.1.1.10.APB (Tampão Alkalino).....   | 24             |
| 5.1.2.Meios de Cultura.....   | 24             |
| 5.1.2.1.Meio LB (Luria-Bertani) "líquido" .....   | 24             |
| 5.1.2.2.Meio LB (Luria-Bertani) "líquido" com antibiótico ampicilina.....   | 25             |
| 5.1.2.3.Meio LB (Luria-Bertani) "líquido" com antibiótico zeocina.....  | 25             |
| 5.1.2.4.Meio LB (Luria-Bertani) Low Salt, "líquido".....  | 25             |
| 5.1.2.5.Meio LB (Luria-Bertani) Low Salt, "líquido" com antibiótico<br>zeocina.....   | 25             |
| 5.1.2.6.Meio LB (Luria-Bertani) "sólido".....   | 25             |
| 5.1.2.7.Meio LB (Luria-Bertani) "sólido" com antibiótico ampicilina.....  | 25             |
| 5.2.1.1.RT.....   | 33             |
| 5.2.1.2.PCR.....  |                |
| 5.2.2.Transformação de bactérias <i>E. coli</i> cepa DH5 $\alpha$ por eletroporação de<br>alta voltagem (Eletrotransformação) para as ligações com os vetores<br>"pCR 4-TOPO e pUC19" ..... | 26<br>36<br>26 |
| 5.2.3.Transformação de bactérias <i>E. coli</i> cepa DH5 $\alpha$ por eletroporação de<br>alta voltagem (Eletrotransformação) para as ligações com o vetor<br>"pPICZ $\alpha$ A" .....      | 37<br>37       |
| 5.2.4.PCR de colônia (pPIC-ME).....   | 38             |
| 5.2.5.Seqüenciamento automático dos insertos de interesse.....  | 38             |
| 5.2.6.Transformação em <i>P. pastoris</i> .....   | 38             |
| 5.2.6.1.Eletroporação em <i>P. pastoris</i> .....   | 40             |
| 5.2.7.Seleção das colônias bacterianas (pPIC-ME).....   | 40             |
| 5.2.8.Indução com Metanol.....  | 41             |
| 5.2.9.Análise dos Transformantes de <i>P. pastoris</i> por "ELISA de colônia".....  | 43             |
| 6.RESULTADOS.....   | 43             |
| 6.1.Seqüenciamento do genoma completo DF-01 (DENV-1).....   | 45             |
| 6.2.Clonagem e subclonagem do ME.....   | 48             |
| 7.DISSCUSSÃO.....   | 53             |
| 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 62             |
| 9.APÊNDICE.....   | 63             |
| 9.1.Apêndice 1: Seqüencia completa do isolado (DF-01) DENV-1, deste estudo.   |                |
| 5.1.2.8.Meio LB (Luria-Bertani) Low Salt, "sólido" com antibiótico<br>kanamicina.....   | 33<br>33       |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| 1.Tabela 1: Dados e localidades de ocorrência dos sorotipos DENV.....   | 5  |
| 2.Tabela 2: Seqüências dos “primers” utilizadas para amplificar os fragmentos de 6,8 kb e 5,0 kb das regiões do genoma do DENV-1..... | 30 |
| 3.Tabela 3: Seqüência dos "primers walking" utilizados para seqüenciar o genoma (11 kb) do DENV-1.....                                | 31 |
| 4.Tabela 4: Desenho dos "primers" utilizados para amplificar os fragmentos das regiões ME (2,0 kb).....                               | 33 |
| 5.Tabela 5: Reagentes para uma reação de PCR de colônia para amplificação da região M (569 pb).....                                   | 37 |
| 6.Tabela 6: Resultado do programa ClustalW, estimando a homologia do DF-01 com os demais isolados DENV-1 do Brasil.....               | 44 |
| 7.Tabela 7: Análise das substituições encontradas (aminoácidos) entre o isolado DF-01 e Den1BR/90.....                                | 44 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| 1.Figura 1: Criança apresentando quadro de FHD.....  | 3  |
| 2.Figura 2: Distribuição geográfica dos sorotipos circulantes no Brasil 2001-2004.   | 8  |
| 3.Figura 3: Exemplar de <i>Ae. aegypti</i> .....   | 9  |
| 4.Figura 4: Estrutura do DENV.....   | 12 |
| 5.Figura 5: Foto de uma partícula viral de DENV, visualizada por microscopia.....  | 13 |
| 6.Figura 6: Organização das proteínas virais da família <i>Flaviviridae</i> .....  | 14 |
| 7.Figura 7: Ciclo de temperaturas para PCR utilizados para amplificar os<br>fragmentos de 6,8 kb e 5,0 kb das regiões do genoma do DENV1.....  | 30 |
| 8.Figura 8: Posição e orientação dos “primers walking” utilizados para o<br>sequenciamento do DENV-1.....  | 31 |
| 9.Figura 9: Mapa do vetor de clonagem pCR 4-TOPO.....  | 34 |
| 10.Figura 10: Mapa do vetor de clonagem pUC 19.....  | 35 |
| 11.Figura 11: Mapa do vetor de clonagem pPICZ $\alpha$ A,B,C.....  | 35 |
| 12.Figura 12: Ciclo de temperaturas para PCR de colônia, utilizados para a<br>amplificação da região M.....  | 38 |
| 13.Figura 13: Fotografia do gel de agarose evidenciando os produtos amplificados<br>(regiões 6,8 e 5,0 kb).....  | 43 |
| 14.Figura 14: Árvore filogenética com resultados de alinhamentos de DENV-1<br>brasileiros.....   | 44 |
| 15.Figura 15: Fotografia do gel de agarose evidenciando os produtos amplificados<br>correspondentes à região ME (2,0 kb).....  | 45 |
| 16.Figura 16: Fotografia do gel de agarose evidenciando os produtos amplificados<br>correspondentes à região pPIC-M (500 pb).....  | 46 |
| 17.Figura 17: Membrana apresentando resultado positivo (colônias 2, 4, 5, 7, 9 e<br>10) e negativo (colônia 1) do método Elisa de colônia, clones DF-01 (DENV-1)<br>pPICZ $\alpha$ A-ME..... | 47 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

|                                      |                                   |                                 |                                |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| <b><math>\alpha</math></b>           | alfa                              | <b><math>\mu\text{L}</math></b> | microlitro                     |
| <b>%</b>                             | por cento                         | <b><math>\mu\text{M}</math></b> | micromolar                     |
| <b><math>\Omega</math></b>           | ohms                              | <b>M</b>                        | molar (concentração)           |
| <b><math>^{\circ}\text{C}</math></b> | graus Celsius                     | <b>mg</b>                       | miligramas                     |
| <b>+</b>                             | positivo                          | <b>min</b>                      | minuto                         |
| <b>AOX1</b>                          | álcool oxidase 1                  | <b>mL</b>                       | mililitro                      |
| <b>cDNA</b>                          | DNA complementar                  | <b>mM</b>                       | milimolar                      |
| <b>cms</b>                           | centímetros                       | <b>n<math>^{\circ}</math></b>   | número                         |
| <b>DNA</b>                           | ácido desoxirribonucléico         | <b>nm</b>                       | nanômetro                      |
| <b>dNTPs</b>                         | desoxirribonucleotídeo trifosfato | <b>ng</b>                       | nanogramas                     |
| <b><i>et al.</i></b>                 | et alii, e outros (em citações)   | <b>OD</b>                       | densidade ótica                |
| <b>g</b>                             | velocidade de Rotação             | <b>ORF</b>                      | open reading frame             |
| <b>gr</b>                            | grama                             | <b>pb</b>                       | pares de base                  |
| <b>IgG</b>                           | imunoglobulina G                  | <b>PCR</b>                      | reação de polimerase em cadeia |
| <b>kb</b>                            | kilobases                         | <b>pH</b>                       | potencial de hidrogênio iônico |
| <b>kDa</b>                           | kilodaltons                       | <b>RNA</b>                      | ácido ribonucléico             |
| <b>KV</b>                            | quilovolt (s)                     | <b>rpm</b>                      | rotações por minuto            |
| <b>lb/sq</b>                         | pound square                      | <b>Taq</b>                      | thermus aquaticus (enzima)     |
| <b><math>\mu\text{F}</math></b>      | microfarad                        | <b>TBE</b>                      | tris borate EDTA               |
| <b><math>\mu\text{g}</math></b>      | micrograma                        | <b>U</b>                        | unidade                        |

## 1.RESUMO

Dengue é um dos arbovírus (vírus transmitido por artrópode) mais importante pertencente a família *Flaviviridae*, é o agente causador da doença Dengue nos trópicos e subtropicais. O vírus do Dengue (DENV) possui quatro sorotipos (1, 2, 3, e 4) devido a diferenças nos testes sorológicos.

Pela análise de quatro isolados de DENV-1 do mundo, primers específicos de oligonucleotídeos foram desenhados para clonagem em RT-PCR e amplificação do genoma completo do DENV-1 autóctone do Distrito Federal nº 01021093 (DF-01). A amplificação do genoma completo foi estabelecida em duas regiões (extremidades de 5'- 6,8 kb e 3'- 5,0 kb) clonadas no vetor pCR4, para posterior seqüenciamento. A seqüência do isolado DF-01 foi analisado pelo programa "BlastN" e "ClustalW", onde o isolado deste estudo DF-01 apresentou maior identidade com o isolado Den1BR/90 (Isolado do Rio de Janeiro, 1990).

Com o objetivo final de fornecer o antígeno viral do Dengue para diagnóstico, as proteínas virais M (membrana) e E (envelope) foram sub-clonadas em vetor de expressão da levedura pPICZ $\alpha$  A (denominado pPIC-ME). Uma linhagem da *Pichia pastoris* (GS 115) foi transformada e sua integração foi confirmada por PCR. Os clones positivos foram selecionados e induzidos com metanol por 72 horas a 30° C e posteriormente as colônias foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C). Um ELISA de colônia foi realizado utilizando anticorpo específico monoclonal (anti-HisTag) para o reconhecimento da proteína recombinante contendo a região HisTag e o anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado com fosfatase alcalina. Sete de 8 colônias apresentaram sinais positivos, confirmando a presença de proteínas recombinantes pela transformação do pPIC-ME.

**Palavras-chave:** Dengue, seqüenciamento e *Pichia pastoris*.

## 2.ABSTRACT

Dengue is one of the most important arboviruses (arthropod-borne virus) that belongs to the *Flaviviridae* viral family and a casual agent of Dengue disease in tropical and subtropical countries. Dengue virus (DENV) has four serotypes (1, 2, 3, and 4) by different reaction in serological tests.

By the analysis of four DENV-1 isolates in the world, specific oligonucleotide primers were designated to clone by RT-PCR the whole genome of DENV-1 autochthones of the Federal District n° 01021093 (DF-01) in the aim to reveal its sequence. To clone complete genome, the whole genome was amplified by RT-PCR dividing into two regions (5'- 6.8 kb and 3'- 5.0 kb) and cloned into pCR4 vector. The clones were sequenced and analyzed using “BlastN” e “ClustalW”, and the isolate DF-01 showed much closer identity with Den1BR/90 isolate (The isolate of Rio de Janeiro, 1990).

Aiming to prepare Dengue virus antigens for diagnostic, the viral proteins, membrane and envelop protein genes were subcloned to the yeast expression vector in pPICZ $\alpha$  A (the construct named pPIC-ME), and a *Pichia pastoris* line (GS 115) was transformed and its integration was confirmed by PCR. The positive clones were selected and the protein expression was induced with methanol in the Petri dish for 72 hours at a 30° C and the colonies were transferred onto the nitrocellulose (Hybond-C) membrane. Colony-ELISA was performed using anti-HisTag monoclonal antibody and the secondary antibody of anti-mouse conjugated with alkaline phosphatase. Seven of 8 colonies showed the positive signals with tetrazolium precipitation, as the results of the recombinant protein expression by pPIC-ME transformation.

**Key works:** Dengue, sequencing and *Pichia pastoris*.

### 3.INTRODUÇÃO

O Dengue é uma doença tropical infecciosa (também chamada de febre Dengue), que se manifesta repentinamente e tem como principais sintomas febre, fortes dores de cabeça, olhos, músculos e articulações, inflamação da garganta, sintomas catarrais e em alguns casos erupções cutâneas e inchaços doloridos. Causa a doença cujos sintomas incluem desde infecções inaparentes até quadros de hemorragia e choque, podendo evoluir para a morte. A infecção causada por um vírus, *Dengue virus* (DENV) é transmitida por duas espécies de mosquitos, o *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) e o *Ae. albopictus*.

O registro mais antigo de casos suspeitos de Dengue e seu tratamento (com grandes possibilidades de ser Dengue) foram encontrados em uma enciclopédia chinesa, publicada durante a dinastia Chin (265 a 420 d.C.) sendo editado formalmente em 610 d.C. (dinastia Tang) e outra vez em 992 d.C. (dinastia norte Sung). Assim, pode-se constatar que o Dengue ou uma doença muito similar, apresentou uma grande distribuição geográfica antes do século 18, quando a primeira pandemia conhecida como doença do Dengue começou (Wang *et al.*, 2000).

Nas línguas de influência moura, portuguesa e espanhola o significado da palavra Dengue é afetação, a palavra em ambos os sentidos descreve sintomas da doença (Figueiredo *et al.*, 1997). Esta doença representa um grave problema de saúde pública no Brasil, cujas condições climáticas favorecem a proliferação do *Ae. aegypti*, principal vetor do DENV.

Quatro sorotipos diferentes do vírus do Dengue (DENV-1, 2, 3, e 4) foram descritos como agentes etiológicos desta doença, que causa um spectrum de doenças variando de febre clássica do Dengue (FCD) à febre hemorrágica do Dengue (FHD), que pode progredir a síndrome de choque do Dengue (SCD) e à morte (Santos *et al.*, 2000).

### **3.1.Febre clássica, febre hemorrágica e choque do Dengue**

Uma infecção do Dengue pode ser manifestada em uma escala mais suave dos sintomas da FCD (Halstead, 1988). O quadro clínico é muito variável, a primeira manifestação é a febre alta (39° C a 40° C) de início abrupto seguida de cefaléia, anorexia, astenia, dor retro-orbital, náuseas, vômitos, exantema (erupção cutânea, caracterizada por vermelhidão) e prurido cutâneo. Hepatomegalia dolorosa pode ocorrer ocasionalmente, desde o aparecimento da febre. Alguns aspectos clínicos dependem com frequência da idade do paciente. A dor abdominal generalizada pode ocorrer principalmente nas crianças. Os adultos podem apresentar pequenas manifestações hemorrágicas como: Petéquias (manchas vermelhas na pele, semelhantes a mordeduras de pulgas, que se manifestam no decorrer de algumas doenças agudas), epistaxe (derramamento de sangue pelas fossas nasais), gengivorragia e sangramento gastrointestinal. A doença tem uma duração de 5 a 7 dias. Com o desaparecimento da febre, há regressão dos sinais e sintomas, podendo ainda persistir a fadiga.

Os sintomas iniciais são semelhantes aos da FCD, porém evoluem rapidamente para manifestações hemorrágicas. A FHD (Figura 1) possui uma tendência de evolução para a SCD, a principal característica fisiopatológica associada ao grau de severidade da FHD é a efusão do plasma, que se manifesta através de valores crescentes da hemoconcentração. Os casos típicos da FHD são caracterizados por febre alta, fenômenos hemorrágicos, hepatomegalia e insuficiência circulatória. Com a lesão hepática em decorrência da propagação viral nos hepatócitos, há comprometimento dos fatores de coagulação que associados à inibição da maturação de megariócitos (células precursoras das plaquetas), pode evoluir para um quadro hemorrágico grave (Santos *et al.*, 2002 b).

Após a infecção do vírus, este se dissemina através do sangue para diversos órgãos como: Fígado, baço, nódulos linfáticos, medula óssea, podendo atingir pulmão, coração e trato gastrointestinal (Santos *et al.*, 2002 b).



**Figura 1:** Criança apresentando quadro de FHD.

**Fonte:** WHO - <http://www.medinet.lk/generalpublic/dengue/dhf.htm>

Nos casos graves de FHD, o choque geralmente ocorre entre o 3º e 7º dia da doença (sem os cuidados apropriados), podendo progredir levando ao óbito em menos de 24 horas (WHO, 2002 a).

O tratamento dos pacientes deve ser criterioso, observando os primeiros sinais de choque. O período crítico envolve a transição da fase febril para a afebril, geralmente ocorre após o terceiro dia da doença. Nos casos com menos gravidade, quando os vômitos ameaçarem causar desidratação ou acidose ou houver sinais de hemoconcentração, a re-hidratação pode ser feita em nível ambulatorial (FUNASA, 2002).

Desde o ano de 1970, a WHO (World Health Organization) ou também chamada de OMS (Organização Mundial de Saúde) se empenhou no desenvolvimento e promoção de estratégias para o tratamento e o controle da FHD alcançando popularidade e reconhecimento internacional (WHO, 2002 b).

Foram definidos critérios de classificação das formas de FHD e SCD em 4 categorias, de acordo com o grau de severidade:

Grau 1 - Febre acompanhada de sintomas inespecíficos, em que a única manifestação hemorrágica é a prova do laço (torniquete) positiva;

Grau 2 - Além das manifestações constantes do grau 1, somam-se hemorragias espontâneas leves (sangramento de pele, epistaxe, gengivorragia e outros);

Grau 3 - Falhas circulatórias manifestadas por pulso fraco e rápido, hipotensão, inquietação, pele úmida e fria;

Grau 4 - Choque profundo com pressão sangüínea e pulsos imperceptíveis.

### **3.2.Dengue: Ocorrência e distribuição geográfica**

A doença foi relatada entre 1779 e 1780, tendo ocorrido epidemias na Ásia, América do Norte e África. No século XX, a epidemia global teve início no Sudeste Asiático. Nas Américas, epidemias do Dengue começaram a ocorrer a partir de 1960 (Gubler, 1998).

A febre urbana do DENV é considerada atualmente uma ameaça principal da saúde pública na maioria dos países americanos (Siqueira, 2004). A distribuição da doença no mundo está representada sob a forma de 100 países endêmicos, distribuídos pelas Américas, sudeste da Ásia, sudeste oriental, norte das Ilhas Pacíficas, Pacífico ocidental, África e Mediterrâneo, com crescimento acentuado da doença FCD e SCD nas Américas (UNDP, 2003) sendo o sudeste asiático e o Pacífico ocidental os países mais seriamente afetados (WHO, 2002 b; UNDP, 2003).

O rompimento ecológico no sudeste da Ásia durante e depois da Segunda guerra mundial, criaram condições ideais para a ocorrência de doenças transmitidas por mosquitos e foram nessas condições que uma pandemia global da doença começou. Após a Segunda guerra mundial, a doença tem sido agravada nos últimos quinze anos e emergiu com formas mais severas como FHD e SCD (Gubler & Trent, 1993; Monath, 1994 a). Epidemias

infreqüentes da FCD ocorreram em áreas tropicais até 1950 (citado no Wang *et al.*, 2000). A primeira epidemia conhecida de FHD ocorreu em Manila, Filipinas entre 1953 a 1954 (citado no Pinheiro & Corber, 1997).

Anteriormente a 1970 apenas 9 países apresentaram FHD, desde então o número de casos aumentou (WHO, 2002 a & 2005) e em 1970 o DENV foi re-introduzido nas Ilhas do Pacífico levando a um agravamento das epidemias. Durante os anos de 1980 a 1990, a transmissão do DENV foi intensificada ocasionando uma expansão da distribuição geográfica dos vetores do mosquito e a presença de FHD em países diferentes. Novos tipos de DENV foram introduzidos nas Américas e em alguns países (Tabela 1) (Pinheiro & Corber, 1997).

**Tabela 1:** Dados e localidades de ocorrência dos sorotipos DENV.

| <b>Sorotipos DENV</b> | <b>Ano de ocorrência</b> | <b>Localidade detectada</b>  |
|-----------------------|--------------------------|------------------------------|
| <b>DENV-1</b>         | 1977                     | Américas                     |
| <b>DENV-2</b>         | 1953                     | Trinidad                     |
|                       | 1981                     | Cuba e Américas              |
| <b>DENV-3</b>         | 1977                     | Américas                     |
|                       | 1994                     | Nicarágua, Panamá e Américas |
|                       | 1995                     | Costa-Rica                   |
| <b>DENV-4</b>         | 1981                     | Américas                     |

**Fonte:** Gubler & Clark, 1995; Briseno *et al.*, 1996.

No México DENV-1 foi o sorotipo mais freqüentemente isolado de 1982 a 1995 (47% de todos os isolados), seguido por DENV-4 (30%) e por DENV-2 (21%) (Briseno *et al.*, 1996).

Aproximadamente dois terços da população mundial vivem em áreas com larga

ocorrência de vetores do DENV, principalmente o *Ae. aegypti*. O *Ae. aegypti* espalhou-se por uma área onde vivem cerca de 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo (FUNASA, 2003 b). Todos os quatro sorotipos do DENV estão em circulação ocorrendo também a circulação simultânea dos quatro tipos em muitos países, atualmente o DENV é endêmico em quase todos os continentes com exceção da Europa. Há dados de FHD na Ásia, Américas e em algumas ilhas do Pacífico (Pinheiro & Corber, 1997). Em 2001, mais de 609.000 casos de Dengue foram relatados nas Américas, sendo que 15.000 casos eram do tipo FHD (WHO, 2002 b & 2005).

A OMS estima que atualmente de 50 a 80 milhões de casos da infecção do DENV ocorram no mundo a cada ano (WHO, 2002 a; FUNASA, 2003 a) destes valores, cerca de 550 mil doentes necessitem de hospitalização e 20 mil morrerão em consequência da doença.

### **3.3.Dengue no Brasil: Histórico**

No Brasil, há referências de epidemias por DENV a partir de 1916 em São Paulo/SP e 1923 em Niterói/RJ. Uma re-infestação com confirmação laboratorial, foi observada no ano de 1982 em Boa Vista/RR, onde foram isolados DENV-1 e DENV-4 (Santos *et al.*, 2002 a). A partir de 1986, epidemias clássicas do Dengue surgiram em vários Estados, diagnosticadas como DENV-1 e DENV-2.

Após 50 anos, o DENV-1 foi re-introduzido no Estado do Rio de Janeiro em 1986 resultando em 1 milhão de casos (Monath, 1994 b). Todos os quatro sorotipos do Dengue estão circulando no continente e há um risco elevado da introdução dos outros dois sorotipos (DENV-2 e 3) no Brasil com o aparecimento de grandes epidemias (Schatzmayr, 2000). A introdução do DENV-2 foi detectada em 1990 no Estado do Rio de Janeiro, posteriormente foi observado em Tocantins, Alagoas e Ceará.

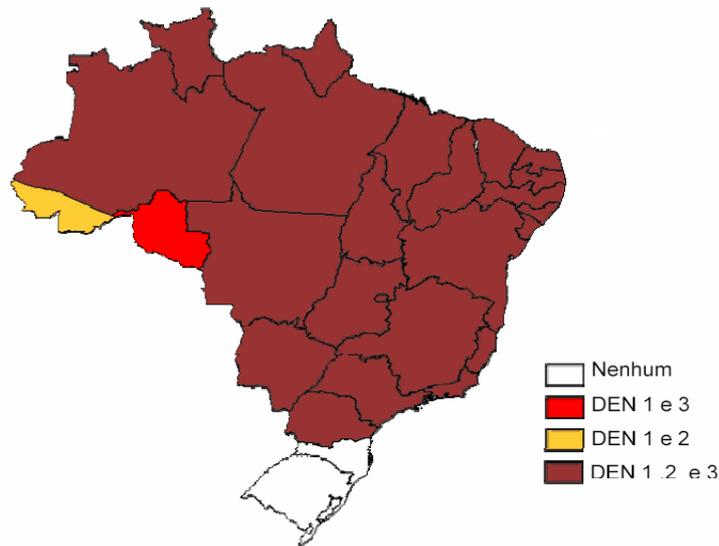
No início de 2001, registrou-se o primeiro caso de Dengue, que tinha como agente

etiológico o sorotipo 3 (Miagostovich *et al.*, 1998 & Santos *et al.*, 2002 a). Atualmente os sorotipos 1, 2 e 3 do DENV circulam em todos os Estados brasileiros, exceto Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 2) (FUNASA, 2003 c).

Estudos moleculares do DENV-1 e DENV-2 do Brasil, demonstraram ser pertencentes aos genótipos do Caribe e Jamaica, respectivamente (Miagostovich *et al.*, 1998). O número e a severidade de casos da doença estão aumentando no Brasil. A série histórica de incidências do DENV no Brasil demonstra uma tendência ascendente da transmissão da doença, atingindo um valor máximo no ano de 2002 (Mondini *et al.*, 2005). O Estado do Rio de Janeiro possui o maior número de casos relatados no Brasil na última epidemia (verão de 2001/2002), mais de 163.000 casos foram relatados, destes 1.400 casos foram de FHD e destes 53 foram óbitos (Lima *et al.*, 2005 a). O maior número de casos da doença no Brasil ocorreu em 2002, com 570.148 casos confirmados (FUNASA, 2002).

Conforme relatórios publicados na FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), o ano de 2002 apresentou a maior incidência de casos no Brasil com 794.013 de casos notificados, comparando com dados de 2003, que apresentou 279.124 casos, 2001 com 428.116 casos e o ano de 2000 com 239.870 casos (FUNASA, 2005). Esses dados evidenciam a alta taxa da doença no Brasil no ano de 2002.

De acordo com dados do Ministério da Saúde, entre janeiro e agosto de 2005, foram notificados 292.599 casos de Dengue em todo o país, o que corresponde a uma queda de 61,9% em relação ao mesmo período de 2004, quando houveram 768.041 casos. Para o Ministério da Saúde, esses números positivos indicam que o Brasil está no caminho certo, mas é absolutamente necessário que sejam mantidas a mobilização social e o trabalho dos órgãos de saúde como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para que o país continue de forma sustentável, a reduzir a ocorrência da doença.



**Figura 2:** Distribuição geográfica dos sorotipos circulantes no Brasil 2001-2004.

**Fonte:** SECRETARIA DE VIGILÂNCIA DE SAÚDE (SVS), boletim da semana 37/2004. [http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/dengue/boletim/pdfs/be\\_dengue\\_37\\_2004.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/dengue/boletim/pdfs/be_dengue_37_2004.pdf)

### 3.4.Etiologia

#### 3.4.1.O agente transmissor/vetor

O DENV pode ser transmitido por duas espécies de mosquitos (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) (Figura 3) (Santos *et al.*, 2002 b), que são mantidas na natureza através de dois ciclos: Urbano (pela transmissão horizontal homem-mosquito-homem) e silvestre (pela transmissão horizontal macaco-mosquito-macaco). A transmissão vertical em vetores *Aedes* também deve ser considerada.

No mês de maio de 1986, foi observado o primeiro exemplar de *Ae. albopictus* no Brasil na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) no Município de Itaguaí-RJ. Novos focos foram reportados na Universidade Federal de Viçosa-MG (UFV) e nas proximidades das cidades de Vitória e Vila Velha-ES (FUNASA, 2001), de *Ae. albopictus* foram coletados em áreas urbanas no município de Manaus-AM indicando que atualmente já

está em circulação no Brasil (Ferreira *et al.*, 2003). Apesar de sua ocorrência o *Ae. albopictus* na Ásia é conhecido como "Mosquito Tigre Asiático", no Brasil ainda não foi apontado como vetor significativo do vírus.

O *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* são espécies hematófagas, sendo que o *Ae. albopictus* apresenta uma fonte alimentar que varia de sangue humano a outros mamíferos e até aves (Gomes *et al.*, 2005).



**Figura 3:** Exemplar de *Ae. aegypti*.

**Fonte:** CDC - <http://www.cbc.ca/story/science/national/2005/02/10/dengue050210.html>

Porém, o principal vetor transmissor da doença Dengue é o mosquito *Ae. aegypti* devido à sua antropofilia, seus habitats urbano-domésticos (domiciliares) e sua alta eficiência na transmissão do vírus.

### **3.4.2. Transmissão do DENV**

O ciclo de transmissão inicia-se com fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* picando um indivíduo que se encontra na fase virêmica da doença (geralmente quatro a cinco dias após a infecção). Posteriormente o DENV multiplica-se no aparelho digestivo do mosquito, atingindo a hemocele e disseminando-se por diferentes tecidos do inseto. Após um período de

incubação em torno de 7 a 11 dias, o vírus chega às glândulas salivares fazendo com que o mosquito se torne apto a iniciar a transmissão viral (McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000).

As fêmeas das *Aedes* spp. podem transmitir o DENV diretamente para a prole, dispensando a passagem pelo homem do seu ciclo. Essa transmissão transovariana é observada a cada um ovo infectado de um total de 500 da prole aproximadamente, esse método de transmissão representa uma forma de adaptação para a sobrevivência do DENV sob condições limitantes, como por exemplo em estações secas ou frias do ano, ausência de locais propícios para a ovoposição e também uma limitação da população de hospedeiros animais ou humanos susceptíveis (Monath, 1994 a).

### **3.4.3. Controle, tratamento e diagnóstico**

O controle da doença é baseado principalmente na eliminação de seu vetor, o mosquito *Ae. aegypti*, através do uso de inseticidas químicos (WHO, 2002 a). Os inseticidas químicos foram usados extensamente no Brasil por diversos anos. Isto expõe populações do mosquito a uma intensa seleção para a resistência aos inseticidas. Em 1999, a FUNASA iniciou o primeiro programa para monitorar a resistência do *Ae. aegypti* aos inseticidas (Lima *et al.*, 2003).

O aumento acentuado da resistência do mosquito aos vários inseticidas químicos e também no aumento da poluição ambiental, resultou no desenvolvimento de alternativas para o controle do mosquito, tal como o uso de agentes biológicos como o *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) (Lima *et al.*, 2005 b).

Não há tratamento específico para o Dengue. O paciente deve manter repouso relativo no domicílio, até cessarem a febre e as mialgias. Não se indica qualquer dieta, mas o doente deverá aumentar a ingestão de líquidos. A recomendação é que não sejam utilizados medicamentos contendo ácido acetilsalicílico e antiinflamatórios não hormonais, já que seu

uso pode favorecer o aparecimento de manifestações hemorrágicas e acidose (Santos *et al.*, 2002 b).

Estudos atuais para tratamento consistem em hidratação e emprego de analgésicos e antitérmicos (paracetamol e dipirona). Soro fisiológico ou solução glicofisiológica são administrados para manter a volemia, sob contínua monitorização tendo em vista a possibilidade de instalar-se o choque. Esta monitorização clínica cuidadosa é realizada nos casos em que há suspeita de FHD ou SCD, e a administração antecipada podem reduzir a letalidade em 50 ou 100 vezes. Nos pacientes sob hidratação venosa, a circulação e o extravasamento vascular são monitorizados a cada duas horas pela verificação do pulso, pressão arterial, perfusão cutânea e débito urinário (Martins & Setúbal, 1990; Santos *et al.*, 2002 b; FUNASA, 2002).

Nos casos mais graves, é importante a reposição de fluídos e eletrólitos, administração de plasma e concentrado de plaquetas (Santos *et al.*, 2002 b; FUNASA, 2002).

Em 1971, reconhecendo a severidade do problema mundial da doença, pesquisadores epidemiológicos das Forças Armadas dos Estados Unidos iniciaram um esforço científico para desenvolver vacinas contra todos os tipos de DENV (1-4). Uma vacina ideal para o Dengue deveria promover uma imunização prolongada contra os quatro sorotipos do DENV. Essa é a principal causa da indisponibilidade de uma vacina eficaz no mercado atualmente (Halstead & Marchette, 2003).

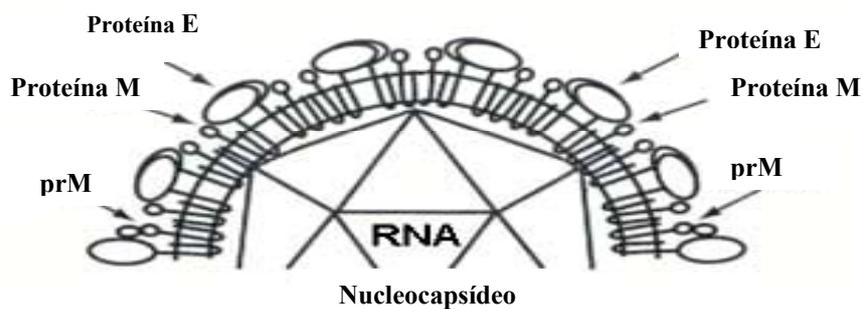
Em todo o mundo, pesquisas estão sendo realizadas para o desenvolvimento da vacina visando a proteína E. A proteína E forma projeções na superfície do vírus além de possuir os determinantes antigênicos para a hemaglutinação e neutralização (Henchal *et al.*, 1985).

### 3.5.DENV: Classificação, morfologia e organização do genoma

#### 3.5.1.Família *Flaviviridae*

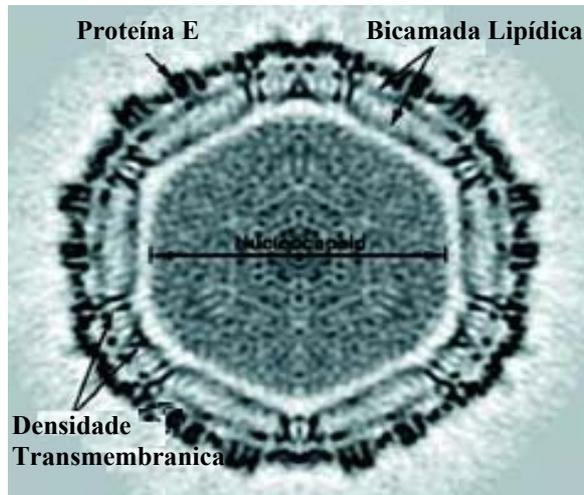
O DENV é um vírus da família *Flaviviridae* na qual os vírions possuem uma forma esférica com 40-60 nm de diâmetro e um envelope lipídico (Regenmortel *et al.*, 2000).

O RNA viral é envolto por um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, composto por uma única proteína denominada C, circundada por uma bicamada lipídica associada às proteínas de membrana (M) e envelope (E) (Figura 4). A proteína E forma projeções de 5-10 nm de comprimento (Figura 5), com terminações arredondadas de cerca de 2 nm de diâmetro, ao longo da superfície externa do vírus (Regenmortel *et al.*, 2000). Os vírions contêm carboidratos na forma de glicolípideos e glicoproteínas, somando um total de 9% do seu volume, a sua composição e estrutura são dependentes das células hospedeiras (vertebrados ou artrópodes).



**Figura 4:** Estrutura do DENV

**Fonte:** [http://www.canalciencia.ibict.br/.../mini/m00194\\_2.jpg](http://www.canalciencia.ibict.br/.../mini/m00194_2.jpg)

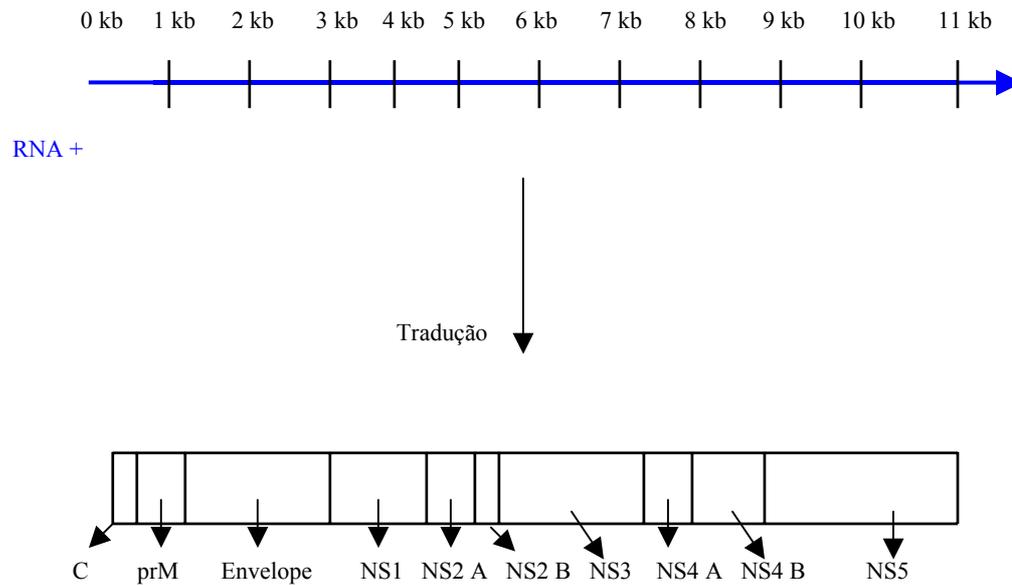


**Figura 5:** Foto de uma partícula viral de DENV, visualizada por microscopia.

**Fonte:** <http://www.lehigh.edu/kadaGlycoprotein>

### 3.5.2.O genoma viral

O genoma do DENV é formado por uma fita simples positiva de RNA que codifica somente uma poliproteína. Essa poliproteína é processada em três proteínas estruturais: Capsídeo (C), pré-membrana (prM) (Flamand *et al.*, 1999) e envelope glicoprotéico (E), e também sete proteínas não-estruturais (NS): NS1, NS2 A, NS2 B, NS3, NS4 A, NS4 B e NS5 (Figura 6). Estudos demonstram a associação de patogenicidade e variabilidade com as proteínas prM, E, NS1, NS3 com regiões não codificadoras (Blok *et al.*, 1991; Men *et al.*, 1996; Kinney *et al.*, 1997; Mangada & Igarashi, 1997 & 1998; Santos *et al.*, 2000; Regenmortel *et al.*, 2000).



**Figura 6:** Organização das proteínas virais da família *Flaviviridae*.

Sítios de N-glicosilação estão presentes nas proteínas prM (1 a 3 sítios), E (0 a 2 sítios) e NS1. Os lipídios presentes no envelope viral dos vírions são derivados de membranas das células hospedeiras e correspondem a 15-20% do peso total da partícula viral.

A proteína C interage com o RNA genômico do vírus, para formar o nucleocapsídeo. A glicoproteína prM forma um heterodímero intracelular, estabilizando a proteína E durante a exocitose. A proteína prM é clivada ante a liberação do vírus pela célula, deixando a pequena proteína estrutural M ancorada no envelope viral.

A proteína M possui 7-9 kDa e consiste em 40 aminoácidos seguidos de uma região transmembranica incluindo dois domínios (Chambers *et al.*, 1990).

A proteína E é a principal proteína do envelope protéico glicosilado e a maior proteína estrutural exposta na superfície do envelope do vírion maduro do vírus, é composta por 495 aminoácidos com massa molecular de 60 kDa. Esta proteína é fundamental para a ligação viral ao receptor de membrana das células hospedeiras e representa os principais domínios

antigênicos virais para a hemaglutinação e neutralização, entre outros (Henchal *et al.*, 1985; Regenmortel *et al.*, 2000). Todos os flavivírus possuem epitopos de grupo comum na proteína do envelope que resulta em extensa reação cruzada em testes sorológicos, sendo difícil o diagnóstico específico para o DENV. A proteína E desempenha atividades biológicas importantes, que incluem montagem do vírion, recepção de ligação, fusão de membrana além de ser o maior alvo para anticorpos de neutralização. Três ramos que desempenham função de epitopos foram caracterizados na proteína E sendo denominados domínios A, B e C. Todos os três domínios contêm epitopos envolvidos com neutralização e inibição de hemaglutinação, mas somente o domínio A contêm epitopos de reação cruzada em flavivírus (Chambers *et al.*, 1990).

A proteína NS1 possui 12 resíduos de cisteína extremamente conservados, sítios de glicosilação invariáveis e regiões de alta homologia de sequência entre os flavivírus e se apresenta sob duas formas principais: Associada à membrana celular e secretada no meio extracelular. Além disso, a circulação de NS1 no sangue dos pacientes durante a fase clínica da doença sugere uma contribuição da proteína não-estrutural ao DENV (Shu *et al.*, 2003). A proteína NS1 com 40 kDa, possui atividade na maturação viral e é encontrada na superfície, ligada à membrana da célula infectada sendo também, secretada. Os níveis de concentração de NS1 no sangue de pessoas infectadas, variam ao longo do processo infeccioso, variando de nanogramas à microgramas por mililitro (Shu *et al.*, 2003). Estes dados representam um importante alvo para o diagnóstico adiantado da infecção.

Está relacionada com o processamento da proteína NS1 a proteína NS2 A, é a primeira das quatro pequenas proteínas hidrofóbicas que é liberada da porção C terminal da NS1 por proteases do retículo endoplasmático (Falgout & Markoff, 1995). As proteínas NS2 B, NS4 A e NS4 B são pequenas, tal como NS2 A e são pouco conservadas entre os flavivírus. Estas proteínas podem formar componentes de membrana nos complexos de replicação viral e

podem estar envolvidas na localização de membrana das proteínas NS3 e NS5 via interação proteína-proteína. A proteína NS3 é muito conservada entre os flavivírus e contém extensões hidrofóbicas pouco longas. A NS5 é uma proteína básica e não possui nenhuma extensão hidrofóbica, está relacionada à ação da RNA polimerase (Chambers *et al.*, 1990).

A NS3 está em contato com a superfície celular ou é secretada, possui capacidade imunogênica. Essa proteína, com 69 kDa é uma enzima bifuncional nucleotídeo trifosfatase/helicase viral. A presença de NS3 estimula a destruição das células infectadas por LT citotóxicos (Barbosa, 1996).

### **3.6. Epidemiologia Molecular**

Segundo Santos *et al.* (2002 a), as proteínas C, prM e E foram conservadas em quase todos os DENV-1 brasileiros com exceção do isolado BR/97-233 (1 aminoácido diferente na posição E-180) e BR-01MR (2 aminoácidos diferentes prM-29 e E-338). Na porção do gene que codifica para as proteínas não-estruturais (NS), foram identificadas 27 substituições dos aminoácidos que distinguiram o isolado BR/97 e as amostras do isolado BR/01.

Holmes *et al.*, (1999) analisaram o genoma do DENV-1 e observaram eventos de recombinação genética em populações naturais do DENV-1. Uma comparação foi feita com um isolado DENV-1 do Brasil (BR/90) e outro da Guiana Francesa (FGA/89). Esses dois isolados possuíam duas regiões distintas que codificam a proteína estrutural E. Nos dois isolados, essa mesma região na sua grande maioria estava relacionada com um isolado de Singapura (DENV-1) de um paciente com FHD.

Estudos foram feitos sobre a recombinação gênica e a evolução do DENV-1, em que a região do gene E apresentou um "breakpoint" (Tolou *et al.*, 2001) comparando com outros estudos dessa mesma região (Holmes *et al.*, 1999), esse resultado sugere que esta região seja possivelmente um "hot spot" para eventos de recombinação viral.

De acordo com esses dados, observa-se a presença de genótipos diferentes e intrasorotípicos do DENV. A comparação desses isolados permite o entendimento da origem dos sorotipos e destinos de dispersão, dados estes primordiais para o entendimento das variáveis do genótipo e conseqüentemente patogenicidade.

Um fato importante a respeito da epidemiologia do DENV diz respeito à origem dos isolados relacionados com a forma mais severa da doença (Rico-Hesse *et al.*, 1997). Devido a limitação na prevenção e controle das epidemias causadas pelo DENV, a epidemiologia molecular mostrou ser uma aliada indispensável na identificação e seleção dos variantes genéticos com a finalidade de diagnosticar as formas mais virulentas da doença (Nogueira *et al.*, 2000).

No Brasil devido às epidemias recentes que assustaram a população, muitos estudos estão sendo realizados desde então com uma atenção especial para os Estados brasileiros que apresentaram as maiores epidemias como no Rio de Janeiro e em São Paulo. Porém no Distrito Federal nenhum estudo direcionado para a distinção dos genótipos intrasorotípicos de DENV foi realizado, esses dados ajudariam a elucidar a origem dos sorotipos 1 e 2 circulantes na região.

No Distrito Federal, os casos positivos e confirmados de DENV são na sua maioria autóctones (ou seja, da região em que a pessoa infectada reside) principalmente do DENV-1. Foram observados também casos da doença diagnosticados como DENV-2, provenientes de outros Estados brasileiros, sendo portanto chamados de casos importados. Como o principal sorotipo circulante no Distrito Federal é do tipo 1, há a necessidade de acompanhamento e estudos epidemiológicos dos casos autóctones pois são endêmicos desta região.

### **3.7. Proteínas do DENV na infecção**

Proteínas candidatas para a expressão foram analisadas, a proteína estrutural E seguida da prM e a proteína não estrutural NS1 foram as mais citadas na literatura.

Os epitopos da proteína E definem a produção de anticorpos específicos para o tipo viral e para virus do Dengue e podem ser detectados por múltiplos testes sorológicos (ensaio imunoenzimático e de imunofluorescência, testes de neutralização, inibição da hemaglutinação e de facilitação da infectividade).

Diversos estudos mostraram que o ectodomínio de M, induz uma resposta que atua neutralizando os anticorpos (Bray & Lai, 1991).

Para Bray & Lai, (1991) a função da prM e da M como antígenos eliciam uma resposta imune protetora ao organismo e a combinação da prM e a proteína E demonstrou ser mais protetora do que a proteína E sozinha, portanto a expressão de ambas as poliproteínas recombinantes prM e E apresentou um nível significativo de proteção.

A proteína NS1 foi utilizada em testes de detecção devido a sua presença no meio extracelular na forma de uma proteína solúvel, encontrada no soro de pacientes infectados pelo DENV (Flamand *et al.*, 1999; Shu *et al.*, 2003). Porém no estudo de Chan *et al.* (2002) a proteína secretada NS1 não foi resistente à atividade de proteases e conseqüentemente foi rapidamente degradada durante a lise celular.

#### **3.7.1. Proteína E**

Durante a década passada, expressões bem sucedidas da proteína E do DENV foram relatadas em diversos sistemas de vetores. A proteína E atua como hemaglutinina viral, induz uma resposta imune e media o ataque do virus à superfície da célula. A proteína E é conseqüentemente um antígeno importante para o desenvolvimento de uma vacina contra o DENV e para uso como reagente (antígeno) no diagnóstico de uma infecção DENV (Sugrue *et al.*, 1997 a & 1997 b; Wei *et al.*, 2003). A proteína E é a principal proteína glicosilada do

envelope exposta na superfície do vírion maduro do Dengue, pode se ligar a receptores na superfície da célula alvo onde ocorrem fusões desses receptores com a membrana celular da célula alvo, resultando em uma infecção viral (Halstead, 1988; Wei *et al.*, 2003). Clonagens foram realizadas utilizando essa proteína viral em diferentes organismos a fim de se obter uma quantidade de proteína recombinante final satisfatória. Alguns estudos demonstraram que a proteína E recombinante expressada em *Escherichia coli* (*E. coli*) possuía muitos dos epítopos neutralizantes presentes no DENV. Estes resultados sugerem que a proteína E recombinante expressa em *E. coli* fornecerá um efetivo antígeno como reagente no diagnóstico da doença (Sugrue *et al.*, 1997 a).

Para Sugrue *et al.* (1997 a) comparando os sistemas de expressão *E. coli* e *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) concluiu-se que para a produção de proteínas recombinantes DENV-E, o sistema *E. coli* demonstrou ser mais eficiente.

O sistema de expressão da levedura *P. pastoris* foi utilizado para produzir a proteína E do DENV-2 pela simplicidade nas técnicas necessárias para a manipulação genética molecular e pela habilidade na produção de proteínas intracelulares ou extracelulares em níveis elevados (Cregg & Higgins, 1995). No estudo de Wei *et al.* (2003) foi demonstrado um alto nível de expressão da proteína E em DENV-2, no sistema *P. pastoris* pela indução com metanol a proteína E permaneceu glicosilada, retendo a sua antigenicidade. Uma resposta plausível para essa divergência entre os dois estudos é o tipo de vetor de clonagem empregado.

Durante a expressão e secreção das proteínas virais recombinantes, degradações proteolíticas foram observadas em resultados de Western blotting, apresentando perdas aproximadas de 30% da proteína recombinante E. Esse tipo de degradação não ocorre especificamente com as proteínas do DENV, mas também com outras proteínas como base de estudo (p. ex. HIV) no sistema de expressão *P. pastoris* (Sugrue *et al.*, 1997 a).

Os Baculovirus foram extensivamente utilizados, porém os resultados demonstraram

baixos níveis de expressão da proteína E (Starapoli *et al.*, 1997), os mesmos resultados foram relatados com o sistema *P. pastoris* (Sugrue *et al.*, 1997 b; Starapoli *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2003).

### **3.8. Expressão em *P. pastoris***

A levedura *P. pastoris* representa um sistema eucariótico alternativo de expressão, apresenta-se na forma metilotrópica e foi largamente utilizada para desenvolver um sistema heterólogo de expressão de proteína como por exemplo, proteínas do DENV. Desde que diversos relatos demonstraram que esta levedura, ao contrário do *S. cerevisiae*, é capaz de expressar glicoproteínas. As glicoproteínas secretadas pela *P. pastoris* contêm mais de 35% dos seus oligossacarídeos N-ligados como estruturas (Grina & Tschopp, 1989). A *P. pastoris* combina muitos dos benefícios da expressão da *E. coli* com as vantagens de um sistema de expressão eucariótico (modificação pós-traducional), que apresenta altos níveis de expressão intracelular e secreção de proteínas heterólogas em concentrações comercialmente úteis alcançando quantidades finais de proteínas a nível de gramas a litros (Invitrogen). Porém, em algumas expressões a quantidade de proteína E do DENV foi muito baixa (Sugrue *et al.*, 1997 b).

*P. pastoris* é capaz de metabolizar metanol como a única fonte do carbono. Quando o metanol é a única fonte de carbono disponível, o promotor do AOX1 é induzido. A primeira etapa no metabolismo do metanol é a oxidação do metanol à formaldeído, pela enzima álcool oxidase. A expressão desta enzima é codificada pelo gene AOX1, regulada e induzida por metanol a níveis altos, acima de 30% da quantidade total de proteína solúvel nas células (Invitrogen; Chen *et al.*, 2000).

Propõe-se neste trabalho a expressão de proteínas recombinantes utilizando o sistema de expressão em *P. pastoris*, por demonstrar ser um sistema mais eficaz que o sistema *E. coli*, e menos oneroso que o sistema Baculovirus.

## 4.OBJETIVO

Seqüenciar o genoma completo e analisar o primeiro isolado do DF, DENV-1 (nº 01021093 (DF-01));

Expressar as proteínas estruturais virais ME do DENV-1, no sistema de expressão *P. pastoris* a fim de servir como antígeno em um kit de diagnóstico para a doença Dengue, visto que, há uma grande necessidade da fabricação de um kit com todos os sorotipos de DENV-1, 2, 3 e 4, para a distribuição em hospitais e laboratórios em geral. Este trabalho visa à obtenção de proteínas para o DENV-1 e servir como estímulo para futuras pesquisas com os outros sorotipos conhecidos.

## 5.MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1.Material

#### 5.1.1.Soluções Estoque

##### 5.1.1.1.10X YNB (Invitrogen)

Composição para 1 litro:

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| YNB (Yeast Nitrogen Base)..... | 134 gr  |
| Água destilada.....            | 1000 mL |

Pesar o YNB, transferir para um tubo e adicionar a água destilada, aquecer o meio até dissolver completamente o YNB. Autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq. Estocar a + 4° C.

##### 5.1.1.2.500X Biotina (0,002%) (Invitrogen)

Composição para 100 mL:

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Biotina.....        | 20 mg   |
| Água destilada..... | 1000 mL |

Pesar a Biotina, transferir para um tubo e adicionar água destilada. Filtrar o meio para ocorrer uma esterilização. Estocar a + 4° C.

##### 5.1.1.3.100X Histidina (0,4%) (Invitrogen)

Composição para 100 mL:

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| Histidina (L-histidine)..... | 400 mg |
| Água destilada.....          | 100 mL |

Pesar a Histidina, transferir para um tubo e adicionar a água destilada, se necessário aquecer para dissolver (até 50° C). Filtrar o meio para ocorrer uma esterilização. Estocar a + 4° C.

#### **5.1.1.4.10X Dextrose (20%) (Invitrogen)**

Composição para 1 litro:

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Dextrose (D-glucose) ..... | 200 gr  |
| Água destilada.....        | 1000 mL |

Pesar a Dextrose, transferir para um tubo e adicionar a água destilada. Autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq. Estocar a + 4° C.

#### **5.1.1.5.10X Metanol (5%) (Invitrogen)**

Composição para 100 mL:

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Metanol.....        | 5 mL  |
| Água destilada..... | 95 mL |

Adicionar a água em um tubo e autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq. Resfriar o tubo (60° C), levar para o fluxo laminar e adicionar Metanol absoluto.

#### **5.1.1.6.Sorbitol 1M (Sambrook & Russel, 1989)**

Composição para 1 litro:

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Sorbitol.....       | 180,2 gr |
| Água destilada..... | 1000 mL  |

Pesar o Sorbitol, transferir para um tubo, adicionar a água destilada. Autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq.. Estocar a + 4° C.

#### **5.1.1.7.PBS 10X (Phosphate-buffered saline) (Sambrook & Russel, 1989)**

Composição para 1 litro:

|  |         |
|--|---------|
| NaCl.....                              | 8 gr    |
| KCl.....                               | 0,2 gr  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 1,44 gr |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....  | 0,24 gr |
| Água destilada.....                    | 800 mL  |

Pesar os componentes sólidos, transferir para um tubo, adicionar a água destilada e ajustar o pH para 7,4, após ajustar o volume para 1 litro com água destilada. Autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq.

#### **5.1.1.8.PBS-T (Washing)** (Sambrook & Russel, 1989)

Composição:

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| PBS 10X (item 5.1.1.7.)..... | 50 mL  |
| Tween 20.....                | 0,5 mL |
| Água destilada.....          | 450 mL |

Medir o PBS 10X para obter uma concentração final de 1X, adicionar a água destilada e o Tween 20, transferir para um tubo e homogenizar.

#### **5.1.1.9.Solução de Bloqueio** (Sambrook & Russel, 1989)

Composição:

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| PBS 10X (item 5.1.1.7.)..... | 50 mL  |
| Leite em Pó.....             | 25 gr  |
| Água destilada.....          | 450 mL |

Pesar o leite em pó, transferir para um tubo, adicionar o PBS 10X e a água destilada. Homogenizar.

#### **5.1.1.10.APB (Tampão Alkalino)** (Sambrook & Russel, 1989)

NaCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

### **5.1.2.Meios de Cultura**

#### **5.1.2.1.Meio LB (Luria-Bertani) "líquido"** (Sambrook & Russel, 1989)

Composição para 1 litro:

|  |         |
|--|---------|
| Triptona (Bacto-tryptone).....                 | 10 gr   |
| Extrato de levedura (Bacto-yeast extract)..... | 5 gr    |
| NACl (Cloroeto de sódio).....                  | 10 gr   |
| Água destilada.....                            | 1000 mL |

Pesar os componentes sólidos, transferir para um tubo e adicionar 950 mL de água destilada ajustar o pH para 7,0 após ajustar o volume para 1 litro com água destilada e autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq..

**5.1.2.2.Meio LB (Luria-Bertani Medium) "líquido" com antibiótico ampicilina** (Sambrook & Russel, 1989)

Composição e preparo idênticos ao item 5.1.2.1., adicionar apenas 1 mL do antibiótico ampicilina (100 mg/mL) em 1000 mL de meio. Estocar a + 4° C.

**5.1.2.3.Meio LB (Luria-Bertani Medium) "líquido" com antibiótico zeocina** (Sambrook & Russel, 1989)

Composição e preparo idênticos ao item 5.1.2.1., adicionar apenas 1 mL do antibiótico zeocina (100 mg/mL) adicionar 0,25 mL em 1000 mL de meio. Estocar a + 4° C.

**5.1.2.4.Meio LB (Luria-Bertani Medium) Low Salt, "líquido" (Invitrogen)**

Composição para 1 litro:

|  |         |
|--|---------|
| Triptona (Bacto-tryptone).....                 | 10 gr   |
| Extrato de levedura (Bacto-yeast extract)..... | 5 gr    |
| NaCl (Cloreto de sódio).....                   | 5 gr    |
| Água destilada.....                            | 1000 mL |

Pesar os componentes sólidos, transferir para um tubo e adicionar 950 mL de água destilada. Ajustar o pH para 7,5 e ajustar o volume para 1 litro com água destilada, autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq..

**5.1.2.5.Meio LB (Luria-Bertani Medium) Low Salt, "líquido" com antibiótico zeocina** (Invitrogen)

Composição e preparo idênticos ao item 5.1.2.4., adicionar apenas 0,25 mL do antibiótico zeocina (100 mg/mL) em 1000 mL de meio. Estocar a + 4° C.

**5.1.2.6.Meio LB (Luria-Bertani) "sólido" (Sambrook & Russel, 1989)**

Composição e preparo idênticos ao item 5.1.2.1., adicionar apenas 15 gr de ágar em 1000 mL de meio.

**5.1.2.7.Meio LB (Luria-Bertani Medium) "sólido" com antibiótico ampicilina** (Sambrook & Russel, 1989)

Composição e preparo idênticos ao item 5.1.2.1., adicionar 15 gr de ágar e 1 mL do

antibiótico ampicilina (100 mg/mL) em 1000 mL de meio. Estocar a + 4° C.

**5.1.2.8.Meio LB (Luria-Bertani Medium) "sólido" com antibiótico kanamicina** (Sambrook & Russel, 1989)

Composição e preparo idênticos ao item 5.1.2.1., adicionar 15 gr de ágar e 1 mL do antibiótico kanamicina (50 mg/mL) em 1000 mL de meio. Estocar a + 4° C.

**5.1.2.9.Meio LB (Luria-Bertani Medium) Low Salt, "sólido" com antibiótico zeocina** (Invitrogen)

Composição e preparo idênticos ao item 5.1.2.4., adicionar 15 gr de ágar e 0,25 mL do antibiótico zeocina (100 mg/mL) em 1000 mL de meio. Estocar a + 4° C.

**5.1.2.10.Meio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) "líquido"** (Invitrogen)

Composição para 1 litro:

|  |        |
|--|--------|
| Extrato de levedura (Yeast extract)..... | 10 gr  |
| Peptona (Peptone).....                   | 20 gr  |
| Dextrose 10X (item 5.1.1.4.).....        | 100 mL |
| Água destilada.....                      | 900 mL |

Pesar os componentes sólidos, transferir para um tubo e adicionar água destilada. Autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq.. Levar o meio para o fluxo laminar para então à ele ser adicionado a solução Dextrose 10X.

**5.1.2.11.Meio YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) "sólido"** (Invitrogen)

Composição para 1 litro:

|  |          |
|--|----------|
| Extrato de levedura (Yeast extract)..... | 10 gr    |
| Peptona (Peptone).....                   | 20 gr    |
| Ágar.....                                | 20 gr    |
| Sorbitol.....                            | 182,2 gr |
| Dextrose 10X (item 5.1.1.4.).....        | 100 mL   |
| Água destilada.....                      | 900 mL   |

Pesar os componentes sólidos, transferir para um tubo e adicionar a água destilada. Autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq.. Levar o meio para o fluxo laminar para então à ele ser adicionado a Dextrose 10X. Placas de Pétri estéreis de 9 cms de diâmetro foram utilizadas para acomodar o meio, posteriormente aguardar 15 minutos para que este solidifique.

**5.1.2.12.Meio YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) "sólido" com antibiótico zeocina (Invitrogen)**

Composição e preparo idênticos ao item 5.1.2.10., apenas adicionar 0,25 mL do antibiótico zeocina (100 mg/mL) em 1000 mL de meio. Estocar a + 4° C.

**5.1.2.13.Meio MMH (Minimal Methanol + Histidine) "sólido" (Invitrogen, a)**

Composição para 1 litro:

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| YNB 10X (item 5.1.1.1.).....        | 100 mL |
| Biotina 500X (item 5.1.1.2.).....   | 2 mL   |
| Histidina 100X (item 5.1.1.3.)..... | 10 mL  |
| Metanol 10X (item 5.1.1.5.).....    | 100 mL |
| Ágar.....                           | 15 gr  |
| Água destilada.....                 | 800 mL |

Pesar o ágar, transferir para um tubo e adicionar a água destilada. Autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq. Levar o meio para o fluxo laminar para então à ele serem adicionados: YNB, Biotina, Metanol e Histidina. Placas de Pétri estéreis de 9 cms de diâmetro foram utilizadas para acomodar o meio, posteriormente aguardar 15 minutos para que este solidifique. Estocar as placas a + 4° C.

**5.1.2.14.Meio MDH (Minimal Dextrose + Histidine) "sólido" (Invitrogen)**

Composição para 1 litro:

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| YNB 10X (item 5.1.1.1.).....        | 100 mL |
| Biotina 500X (item 5.1.1.2.).....   | 2 mL   |
| Histidina 100X (item 5.1.1.3.)..... | 10 mL  |
| Dextrose 10X (item 5.1.1.4.).....   | 100 mL |
| Ágar.....                           | 15 gr  |
| Água destilada.....                 | 800 mL |

Pesar o ágar, transferir para um tubo e adicionar a água destilada. Autoclavar a 121° C por 20 minutos a 15 lb/sq. Levar o meio para o fluxo laminar para então à ele serem adicionados: YNB, Biotina, Dextrose e Histidina. Placas de Pétri estéreis de 9 cms de diâmetro foram utilizadas para acomodar o meio, posteriormente aguardar 15 minutos para que este solidifique. Estocar as placas a + 4° C.

### **5.1.3.Eletroforese: Preparo do gel** (Sambrook & Russel, 1989)

Gel de agarose 1% (para DNA)

Composição para 1 litro:

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Agarose.....           | 10 gr    |
| TBE 1X.....            | 1000 mL  |
| Brometo de Etídeo..... | 0,282 mL |

Pesar a agarose, transferir para um tubo, adicionar o TBE 1X e o brometo de etídeo. Aquecer no aparelho de microondas e transferir para a cama de uma cuba de gel de eletroforese.

### **5.1.4.Obtenção das amostras de DENV-1**

As amostras estocadas no LACEN-DF (Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal) foram previamente inoculadas em cultura de células de *Ae. albopictus* clone C6/36 (Igarashi, 1978), os diferentes sorotipos são identificados através da técnica de imunofluorescência com anticorpos monoclonais para os sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. O estabelecimento de uma cooperação entre pesquisadores do LACEN-DF e da UCB (Universidade Católica de Brasília) possibilitou que o LACEN-DF gentilmente cedesse o isolado do DENV-1 (n° **01021093**).

#### **5.1.4.1. Inoculação do DENV em células C6/36**

Para a realização deste trabalho, inoculou-se o DENV-1 em células de *Ae. albopictus* linhagem C6/36, crescidas por 48 horas em uma microplaca. Utilizando ponteiras com filtro, o soro positivo com DENV-1 de um paciente foi inoculado diretamente no orifício da placa e incubado em estufa a 25° C por 3-5 dias. A segunda passagem foi realizada inoculando-se o meio de cultura da primeira passagem, incubando por 7 dias.

Após esse período de incubação, ressuspendeu-se completamente as células em monocamada, aliquotando-as em 200 µL para microtubos de 1,5 mL, sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido antes de serem armazenadas em freezer a -80° C.

#### **5.1.4.2. Extração de RNA viral**

Para a extração de RNA viral das células de *Ae. albopictus* (2ª passagem, estocadas no freezer a -80° C) foi utilizado o "Mini Kit-RNeasy" (Qiagen) (conforme as instruções do fabricante). As amostras de RNA extraídas foram aliquotadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -80° C.

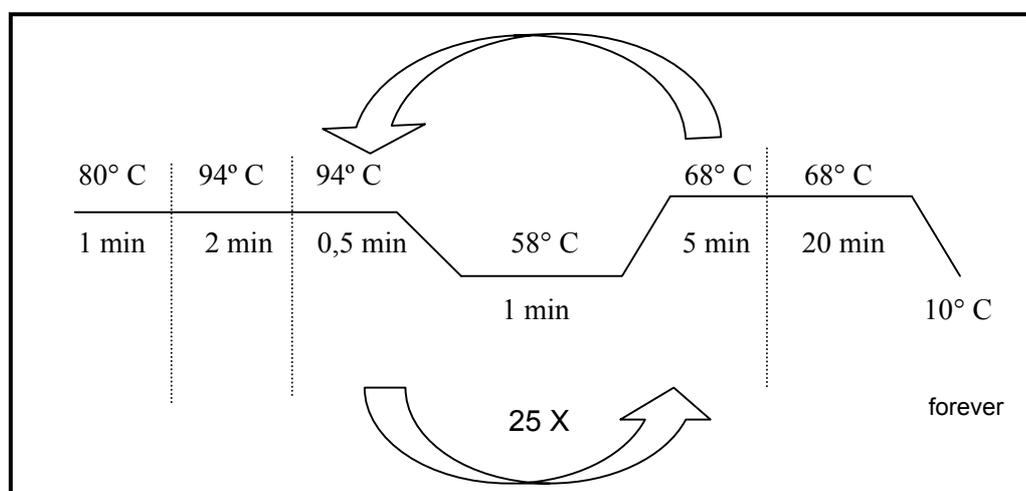
#### **5.1.4.3. Desenho dos "primers" específicos para o genoma do DENV-1**

Para a determinação das seqüências dos "primers" (ou iniciadores) a serem utilizados neste trabalho foi realizada uma análise em banco de dados, dos genomas completos do DENV-1 depositados no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) em que os isolados utilizados foram BR/97-233, BR/97-409, BR/01-MR, BR/97-111 e Den1BR/90.

Os genomas são provenientes do Brasil e apresentaram identidades completas com as regiões terminais dos isolados selecionados. Baseada em análise de alinhamento múltiplo destas seqüências, dois pares de "primers" foram desenhados (Tabela 2 e Figura 7) com a finalidade de amplificar duas grandes regiões, extremidades de 5' e 3', uma com 6,8 kb e a outra com 5,0 kb respectivamente, totalizando os 11 kb do genoma do vírus.

**Tabela 2:** Seqüências dos "primers" utilizadas para amplificar os fragmentos de 6,8 kb e 5,0 kb das regiões do genoma do DENV-1.

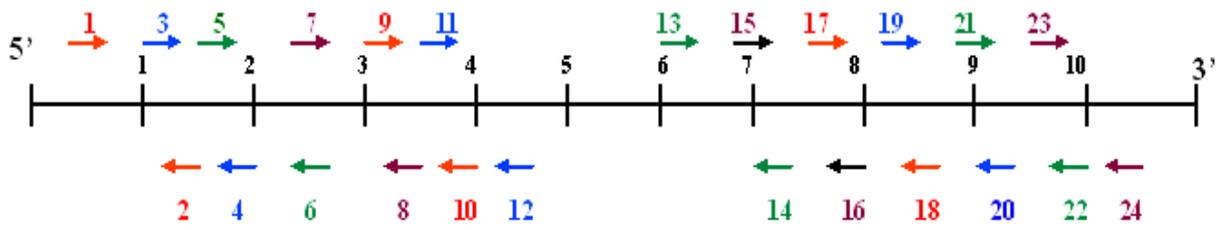
| "Primers"        | Seqüências dos Nucleotídeos         |
|------------------|-------------------------------------|
| DEN-5 Senso      | CTACGTAGTTGTTAGTCTACGT              |
| DEN-5 Anti-senso | CCAATCCCCAGGTCTTTCTTTG              |
| DEN-3 Senso      | GATGGTGCTGCTCATTCCAGA               |
| DEN-3 Anti-senso | GGGTTAATTAAGAACCTGTTGATTCAACAGCACCA |



**Figura 7:** Ciclo de temperaturas para PCR utilizados para amplificar os fragmentos de 6,8 kb e 5,0 kb das regiões do genoma do DENV-1.

#### 5.1.4.4. Desenho dos "primers" específicos ("primers walking") para o genoma (11 kb) do DENV-1

Para o seqüenciamento do genoma completo do DENV-1, foram desenhados "primers walking" (Tabela 3) baseados em 5 alinhamentos de isolados DENV-1 brasileiro (AF 311958 - BR/97-233 (Rio de Janeiro), AF 513110 - BR-01MR (Paraná), AF 311957 - BR/97-409 (Pernambuco), AF 311956 - BR/97-111 (Pernambuco), AF 226685 - Den1BR/90 (Rio de Janeiro)) com a finalidade de seqüenciar o genoma completo do DENV-1 do DF. O esquema contendo o desenho da posição de anelamento dos "primers walking" está na Figura 8.



Primer 1: 453

Primer 2: 1268-1288

Primer 3: 1129-1151

Primer 4: 1950-1973

Primer 5: 1779-1803

Primer 6: 2602-2623

Primer 7: 2453-2476

Primer 8: 3275-3296

Primer 9: 3159-3181

Primer 10: 3701-3723

Primer 11: 3561-3579

Primer 12: 4311-4333

Primer 13: 6091-6118

Primer 14: 7183-7204

Primer 15: 7046-7067

Primer 16: 7864-7882

Primer 17: 7689-7709

Primer 18: 8508-8528

Primer 19: 8361-8383

Primer 20: 9127-9148

Primer 21: 8987-9009

Primer 22: 9811-9834

Primer 23: 9641-9662

Primer 24: 10443-10461

**Figura 8:** Posição e orientação dos “primers walking” utilizados para o seqüenciamento do DENV-1.

**Tabela 3:** Seqüência dos "primers walking" utilizados para seqüenciar o genoma (11 kb) do DENV-1.

| <b>"Primers"</b> | <b>Seqüências dos Nucleotídeos</b> |
|------------------|------------------------------------|
| 1 Senso          | GGGCAGAGAACTCAAATGTGG              |
| 2 Anti-senso     | TGGCACACGTCAATAGGCTTC              |
| 3 Senso          | TATCAAACACCACCACCATTC              |
| 4 Anti-senso     | GTCACTCCTTTCTCATCTTGG              |
| 5 Senso          | CCTGAAATGCAGACTAAAAATGG            |
| 6 Anti-senso     | CCACATGATGTTCTCAAGACGC             |
| 7 Senso          | GAACTCAAATGTGGAAGTGGCAT            |
| 8 Anti-senso     | TCCACAATGTTTCATCCACAAC             |
| 9 Senso          | TGGAGGACCAATATCTCAGCAC             |
| 10 Anti-senso    | CATTTTGAAAGTAGCCATCAAGGC           |
| 11 Senso         | GAAAGATGCTGATGACTG                 |
| 12 Anti-senso    | GAGTGTTCTGCTTCTTCTTCCC             |
| 13 Senso         | ACTGCGGGGAGAAGCGAGGAAAA            |
| 14 Anti-senso    | CAGTCCTGGTCCAATTATGGCA             |
| 15 Senso         | GCTATATTGATGGGACTTGAC              |
| 16 Anti-senso    | GTGTATCCCTTCACTTCAGTG              |
| 17 Senso         | CCGAAGCCAAAGAGGGACTGAAA            |
| 18 Anti-senso    | TAGATGAGGCTGATCCTGATG              |
| 19 Senso         | ATGTGGCAGTGGAACCAGAGGTA            |
| 20 Anti-senso    | CGGAATCTTTGATATGTCTCTG             |
| 21 Senso         | GCAATATGGTATATGTGGCTGGG            |
| 22 Anti-senso    | AGGCAAGCAGTTTCTCTCAGG              |
| 23 Senso         | ATACCGCAGTGGGAACCTTCA              |
| 24 Anti-senso    | TTTACATCCCCACGATGGAG               |

#### 5.1.4.5. Desenho dos "primers" específicos para as proteínas ME do DENV-1

As sequências do vírus foram alinhadas no programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) do EBI (European Bioinformatics Institute), nos "primers" (Tabela 4) desenhados para amplificar as regiões dos genes M e E do DENV-1 foram inseridos sítios de endonucleases de restrição, *Eco* RI no primer Senso e *Sal* I no primer Anti-senso.

**Tabela 4:** Desenho dos "primers" utilizados para amplificar os fragmentos das regiões ME (2,0 kb).

| <b>"Primers"</b> | <b>Seqüências dos Nucleotídeos</b> |
|------------------|------------------------------------|
| ME Senso         | CGGAATTCCATTTGACCACACGAGGGG        |
| ME Anti-senso    | ACGCGTCGACCGCTTGAACCATGACTCCTAG    |

OBS. Os nucleotídeos sublinhados especificam os sítios de digestão das enzimas de restrição (ME Senso sítios de *Eco* RI; ME Anti-senso sítios de *Sal* I).

## 5.2. Métodos

### 5.2.1. Reações de transcrição reversa (RT) e reação de polimerase em cadeia (PCR)

#### 5.2.1.1. RT

Para a síntese do cDNA do DENV, foram realizadas reações de transcrição reversa (RT) utilizando o RNA extraído (5.1.4.2.) das amostras do DENV-1 e a enzima Super Script III RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen) conforme recomendação do fabricante.

#### 5.2.1.2. PCR

O produto da RT, foi usado para a obtenção do cDNA pela técnica de PCR, onde dois pares de "primers" específicos DEN-5 Senso, DEN-5 Anti-senso, DEN-3 Senso e DEN-3 Anti-senso (Tabela 2) foram utilizados para amplificação de dois grandes fragmentos (6,8 kb e 5,0

kb) de DNA do genoma do DENV-1.

O cDNA também foi utilizado para uma amplificação específica em que um par de "primers" específicos ME Senso e ME Anti-senso (Tabela 4) foi utilizado para amplificar a região contendo as proteínas não estruturais M-E (2,0 kb). Para cada reação, adotou-se um ciclo com temperaturas e tempo variados, realizados no Termociclador Mastercycler (Eppendorf).

A especificidade das reações foi confirmada pelo tamanho dos fragmentos de PCR por eletroforese em gel de agarose (5.1.3.). O DNA, amplificado por PCR e digerido com as enzimas restrição adequadas, foi separado por eletroforese em gel de agarose e fotografado através do programa Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak) e posteriormente eluído utilizando o kit "Qiaex II Agarose Gel Extraction" (Quiagen) conforme recomendação do fabricante. O fragmento 6,8 kb e o fragmento 5,0 kb foram clonados separadamente no vetor pCR 4-TOPO e o fragmento ME foi clonado no vetor pUC 19, em seguida esses clones foram transformados em bactéria *E. coli* cepa DH5  $\alpha$  (Invitrogen) por eletroporação. Os clones foram selecionados e posteriormente foi feita uma extração de plasmídeos através de kit para "Miniprep" (Promega) conforme recomendação do fabricante. Os clones selecionados foram seqüenciados no seqüenciador automático Perkin Elmer ABI-Modelo 377.

Após a confirmação da clonagem em vetor pCR 4-TOPO (Figura 9), o material resultante do "Miniprep" foi utilizado como base para ser novamente seqüenciado, foram utilizados 24 "primers" ("primers walking") para seqüenciar em pedaços, como em um "contig" do genoma do DENV-1.

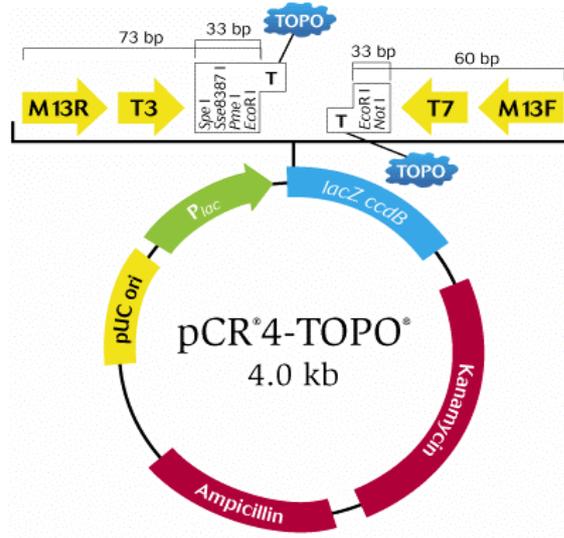


Figura 9: Mapa do vetor de clonagem pCR 4-TOPO.

Após a confirmação da clonagem em vetor pUC 19 (Figura 10), o gene de ME foi isolado utilizando-se as enzimas de restrição *Eco* RI e *Sal* I (Amersham Biosciences) e subclonado no vetor de expressão específico para o sistema *P. pastoris*, pPICZα A (Invitrogen) (Figura 11).

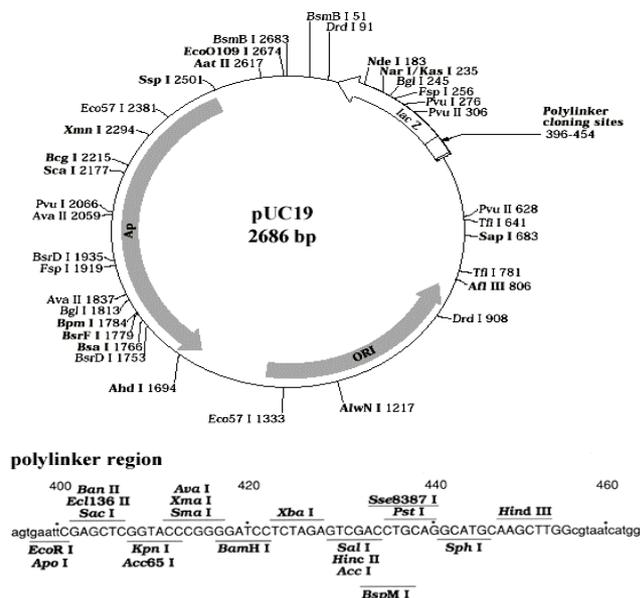


Figura 10: Mapa do vetor de clonagem pUC 19.

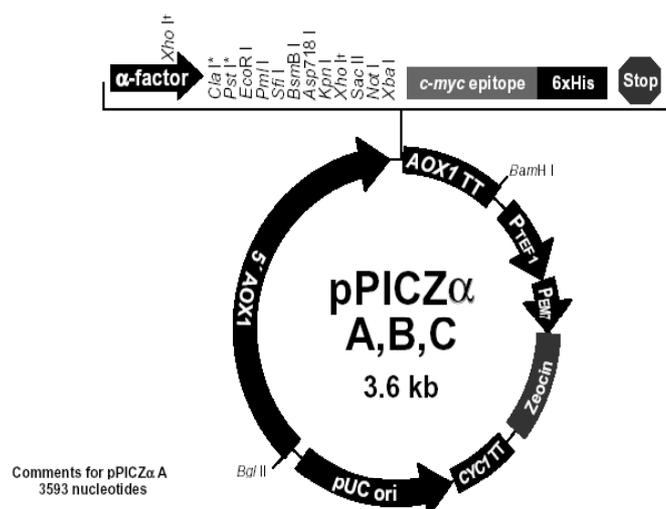


Figura 11: Mapa do vetor de clonagem pPICZ $\alpha$  A,B,C.

### 5.2.2. Transformação de bactérias *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ por eletroporação de alta voltagem (Eletrotransformação) (Chassy & Flickinger, 1987), para as ligações com os vetores “pCR 4-TOPO e pUC 19”

Para a realização desta técnica, utilizaram-se células competentes *E. coli* cepa DH5  $\alpha$  devidamente preparadas e armazenadas a  $-80^{\circ}$  C (segundo o protocolo de Sambrook & Russel, 1989).

O equipamento utilizado para esta técnica foi o Gene Pulser II (Bio Rad) sendo as condições ideais para a eletroporação: Capacitância de 25  $\mu$ F; resistência mínima de 200  $\Omega$  e máxima de 700  $\Omega$ ; voltagem de 1,80 KV. O procedimento de preparo da reação foi feito em um fluxo laminar, onde foram aliqüotados 1  $\mu$ L de reação de ligação em um microtubo de 1,5 mL contendo 40  $\mu$ L de células eletro-competentes *E. coli* DH5  $\alpha$ . Após homogenizada, essa reação foi transferida para uma cuveta específica (Gene Pulser Curvette (Bio-Rad)). A cuveta foi fechada e acoplada no aparelho, o eletroporador foi ligado, a mensuração da corrente elétrica foi cuidadosamente anotada. Após esse procedimento a cuveta foi levada para o fluxo laminar e foi adicionada à ela 1 mL de meio de cultura LB líquido (5.1.2.1.), homogenizou-se

cuidadosamente sendo essa mistura transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril. O tubo contendo a transformação foi incubado com agitação de 240 rpm por uma 1 hora a 37° C.

Enquanto transcorria o tempo de incubação, uma placa de Pétri com meio LB sólido (5.1.2.7.) com o antibiótico ampicilina para pUC 19 e kanamicina para pCR4, foi separada e nela foram distribuídos com o auxílio de uma alça de Drigalski 40 µL de X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-B-D-Galactoside) a 20 mg/mL, 10 µL de IPTG (Isopropylthio-B-D-Galactoside) a 200 mg/mL e 50 µL de água, posteriormente deixou-se a placa entre-aberta perto de um bico de Bunsen para que os reagentes líquidos secassem.

Decorrida a hora da incubação da transformação, o tubo foi centrifugado em uma centrífuga 5804 R (Eppendorf) a 4.000 x g por 4 minutos e o sobrenadante (800 µL) foi descartado, restando apenas 200 µL que foram aplicados sobre a placa de Pétri preparada acima, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após essa placa foi levada para uma estufa a 37° C por 12 a 16 horas.

O procedimento descrito acima, foi realizado para as ligações de fragmentos de DNA aos vetores pCR 4-TOPO e pUC 19.

### **5.2.3. Transformação de bactérias *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ por eletroporação de alta voltagem (Eletrotransformação) (Chassy & Flickinger, 1987), para as ligações com o vetor “pPICZ $\alpha$ A”**

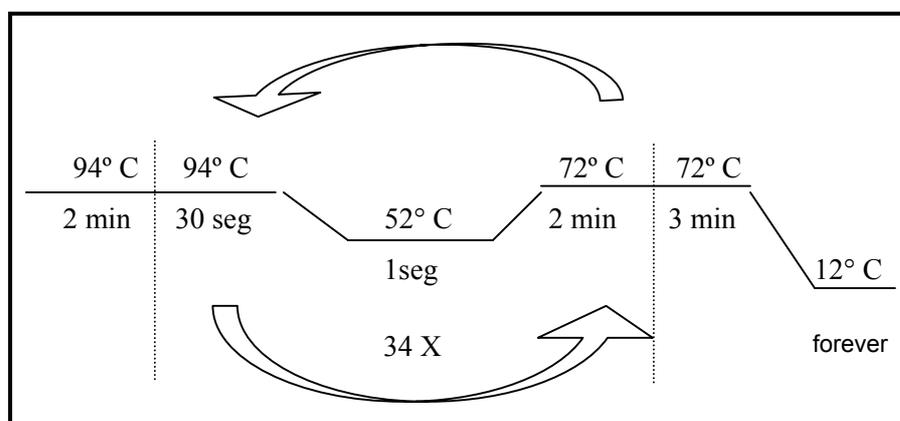
Seguir o mesmo procedimento do item 5.2.2., substituir o LB líquido por LB Low Salt líquido (5.1.2.4.) e LB sólido com antibiótico ampicilina por LB Low Salt sólido (5.1.2.9.) com antibiótico zeocina.

#### 5.2.4.PCR de colônia (pPIC-ME)

As colônias crescidas e transformadas (5.2.3.) foram utilizadas como componentes (DNA) de uma reação de PCR, para isso foram diluídas em água. Esta solução bacteriana foi incubada a 100° C por 5 minutos e utilizada como molde para a reação de amplificação descrita na Tabela 5 e Figura 12. Os primers que anelam a parte interna do gene ME (M-PVX-Seq, M-PVX-As-Seq) foram utilizados. A amplificação do fragmento de tamanho esperado representou a clonagem correta do gene de interesse.

**Tabela 5:** Reagentes para uma reação de PCR de colônia para amplificação da região M (569 pb).

| Reagentes                                | Volume (µL)  |
|--|--------------|
| Água Milli-Q autoclavada                 | 14,2 µL      |
| Tampão 10X                               | 2 µL         |
| dNTPs (2,5 mM)                           | 1 µL         |
| Primer M-PVX-As (Senso) (10 µM)          | 0,3 µL       |
| Primer M-PVX (Anti-senso) (10 µM)        | 0,3 µL       |
| colônia (diluída em água Milli-Q)        | 2 µL         |
| Enzima Taq (Pht) DNA polimerase (5 U/µL) | 0,2 µL       |
| <b>Volume final</b>                      | <b>20 µL</b> |



**Figura 12:** Ciclo de temperaturas para PCR de colônia, utilizados para a amplificação da região M (569 pb).

### **5.2.5. Seqüenciamento automático dos insertos de interesse**

Com a finalidade de se obter as seqüências de nucleotídeos dos fragmentos de cDNA correspondentes ao genoma completo do DENV-1 do Distrito Federal, foi realizado o seqüenciamento automático dos plasmídeos obtidos. Para tanto, utilizou-se o kit de seqüenciamento "DYEnamic ET Terminator Cycle Sequence" (Amersham Biosciences), os "primers" desenhados e o seqüenciador automático ABI-Modelo 377.

### **5.2.6. Transformação em *P. pastoris***

#### **5.2.6.1. Eletroporação em *P. pastoris***

Para a realização desta técnica, utilizaram-se células cepa GS 115 que foram crescidas em meio YPDS sólido (5.1.2.11.) e posteriormente foram incubadas em uma estufa a 28° C por 2 -3 dias. Todo o procedimento foi feito em câmara de fluxo laminar. Foi crescida uma única colônia de GS 115 em 5 mL de meio YPD líquido (5.1.2.10.) acomodados em um erlenmeyer de 125 mL durante a noite a 30° C, sob agitação de 250 rpm (pré-inóculo). Foi inoculado 0,1 a 0,5 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio YPD líquido (5.1.2.10.) (inóculo) (divididos em 2 tubos erlenmeyers de 500 mL, portanto 250 mL de inóculo cada tubo). O meio foi crescido durante a noite a 30° C, sob agitação de 250 rpm até ter obtido uma absorbância (OD 600) de 1,3-1,5. Posteriormente as células foram centrifugadas em uma centrífuga 5804 R (Eppendorf) a 1.500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ressuspenso com 500 mL de água gelada estéril.

As células foram centrifugadas (com a mesma velocidade e tempo acima), o sobrenadante foi descartado e ressuspenso com 250 mL de água estéril gelada, após este passo foi novamente repetido (centrifugação e ressuspenso em água). Posteriormente, as células foram centrifugadas novamente como acima, o meio foi descartado e o sobrenadante foi ressuspenso em 20 mL de Sorbitol 1M (5.1.1.6.) gelado. A suspensão de células foi

transferida para um tubo de centrífuga menor onde foi novamente centrifugado em uma centrífuga 5804 R (Eppendorf) a 1.500 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 0,5 mL de Sorbitol 1M (5.1.1.6.), para a obtenção de um volume final de 1,5 mL de células (células competentes).

O equipamento utilizado para esta técnica foi o Gene Pulser II (Bio Rad) sendo as condições ideais para a eletroporação: Capacitância de 25  $\mu$ F; resistência mínima de 400  $\Omega$  voltagem de 1,50 KV. O procedimento de preparo da reação foi feito em um fluxo laminar onde foi separado um microtubo de 1,5 mL contendo 320  $\mu$ L de Sorbitol 1 M (5.1.1.6.), onde foram adicionados à ele 80  $\mu$ L de células competentes e o DNA linearizado (ME - com a enzima *Pme* I) da amostra, contendo de 5 a 10  $\mu$ g de material ressuspensos em 5 a 10  $\mu$ L de água deionizada (Milli-Q). A solução foi homogenizada e transferida para uma cuveta específica, Gene Pulser Curvette (Bio-Rad). Após esse procedimento a cuveta foi levada para o fluxo laminar onde foi adicionada 1 mL de Sorbitol 1M (5.1.1.6.) gelado, a reação foi homogenizada e transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril, esse microtubo contendo a transformação foi incubado a 30° C por 1 hora.

Após foram separadas 2 placas de Pétri com meio YPDS sólido (5.1.2.12.) contendo antibiótico zeocina. Foram plaqueados 100  $\mu$ L da transformação com o auxílio de uma alça de Drigalski e os 900  $\mu$ L restantes foram centrifugados em uma centrífuga 5804 R (Eppendorf) a 5.000 x rpm por 2 minutos. O sobrenadante (800  $\mu$ L) foi descartado, os 100  $\mu$ L restantes foram usados para plaquear na segunda placa de Pétri contendo meio YPDS sólido (5.1.2.12.) contendo antibiótico zeocina. As duas placas foram levadas para a estufa 28° C por 2-3 dias.

### **5.2.7. Seleção das colônias bacterianas (pPIC-ME)**

Passados os 2-3 dias de crescimento de uma transformação em *P. pastoris* (5.2.6.) foi observado o surgimento de algumas colônias. Posteriormente foi feita uma reação de PCR de colônia (5.2.4.) para selecionar os clones positivos, ou seja, que possuem o inserto ME.

### **5.2.8.Indução com Metanol**

As colônias positivas selecionadas (5.2.7.) e um controle negativo (colônia de *P. pastoris* mais vetor/ sem inserto (transformados (5.2.6.), repicado como nº 1)), foram repicados na placa contendo meio MMH (5.1.2.13.) sólido para a indução em placa com metanol. Como o crescimento em placa ocorre com a disposição da placa invertida, a adição de metanol absoluto foi feita na tampa interna da placa a cada 24 horas a uma concentração final de 1%, portanto foi adicionado 0,3 mL de metanol absoluto. A indução foi feita do tempo 0, 24, 48 até 72 horas.

### **5.2.9.Análise dos Transformantes de *P. pastoris* por “ELISA de colônia”**

A análise foi realizada em placas contendo colônias selecionadas e a expressão induzida por metanol. Sobre a placa contendo o meio MMH (5.1.2.13.) sólido foram colocados uma membrana de nitrocelulose (Hybond C-Extra, Amersham Biosciences) diretamente em contato com as colônias, 3 folhas de papel filtro (Watmann 3 MM) e várias camadas de papel toalha. A transferência foi realizada por uma hora.

A membrana de nitrocelulose foi retirada e lavada para retirar o excesso de células sob agitação por 3 vezes (3 minutos cada lavagem) em solução PBS-T (5.1.1.8.).

A membrana foi seca e incubada com a solução de bloqueio (5.1.1.9.) por no mínimo 1 hora, sob agitação. Após descartar a solução de bloqueio e fazer uma lavagem na membrana do mesmo modo com PBS-T (5.1.1.8.), posteriormente adicionou-se o anticorpo primário anti-His-Tag diluído (1 µg/mL) em 10 mL de solução PBS-T (5.1.1.8.), incubar sob agitação por 4 horas. Descartou-se essa solução e a membrana foi lavada com a solução PBS-T (5.1.1.8.) por 3 vezes (3 minutos cada lavagem) sob agitação, seguido da adição do anticorpo secundário conjugado, anti-Mouse (IgG) (Sigma) conjugado com fosfatase alcalina diluído (0,1 µg/mL) em 10 mL de solução PBS-T (5.1.1.8.). A incubação foi feita sob agitação por 1

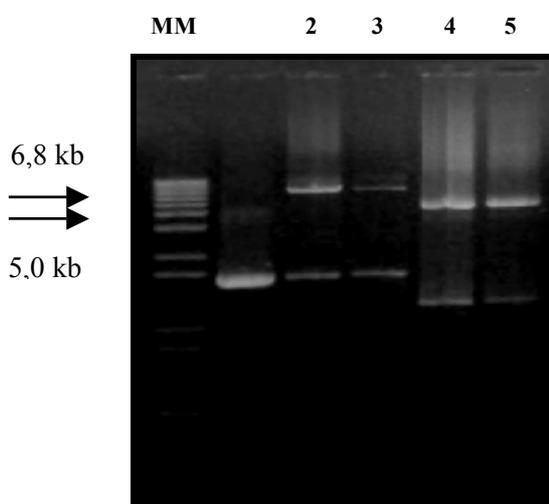
hora.

A membrana foi então lavada com água destilada, seguida de 10 mL de solução APB (5.1.1.10.) e por último a membrana foi lavada sob agitação por mais 3 vezes (3 minutos cada lavagem) com a solução PBS-T (5.1.1.8.). A visualização da reação foi feita com a adição de 10 mL de solução APB (5.1.1.10.) e solução reveladora, 33  $\mu$ L de BCIP (50 ng/mL em 100% dimetilformamida) e 66  $\mu$ L de NBT (50 ng/mL em 70% dimetilformamida). Após a reação, a membrana foi lavada 3 vezes com água destilada e seca sobre papel filtro.

## 6.RESULTADOS

### 6.1.Seqüenciamento do genoma completo DF-01 (DENV-1)

O isolado 01021093 (DF-01) do DENV-1 autóctone circulante no Distrito Federal foi selecionado para ser a base de estudo para este trabalho. Com a finalidade de seqüenciar o genoma completo do DENV-1 (Apêndice 1), "primers" foram desenhados para amplificação de regiões específicas no genoma do DENV-1, para isso o primeiro passo foi a obtenção do cDNA do DENV-1 pela técnica RT-PCR e logo após a reação de PCR foi feita com dois pares de "primers" (Tabela 2) desenhados para amplificar duas grandes regiões (6,8 kb e 5,0 kb) do genoma do DENV-1. Com o resultado esperado em pares de bases (Figura 13) visualizado em gel de agarose (5.1.3.), pares de "primers walking" (Tabela 3) foram desenhados para seqüenciar essas duas grandes regiões do genoma.



**Figura 13:** Fotografia do gel de agarose evidenciando os produtos amplificados (regiões 6,8 kb e 5,0 kb). Poço MM (Marcador Molecular 1kb Plus Ladder); Poços 2 e 3 (Isolado DF-01 (PCR – DENV-1) tamanho 6,8 kb e Poços 4 e 5 (Isolado DF-01 (PCR – DENV-1) tamanho 5,0 kb).

Através da análise, o isolado DF-01 apresentou 99% de homologia com os isolados do RJ (Den1BR/90) e BR/97-409 pelo programa ClustalW (Tabela 6), devido à alta homologia e identidade entre as seqüências de nucleotídeos. Analisando as seqüências alinhadas observou-se que o isolado DF-01 possuía seis mutações de aminoácidos no total comparando com Den1BR/90 (Tabela 7).

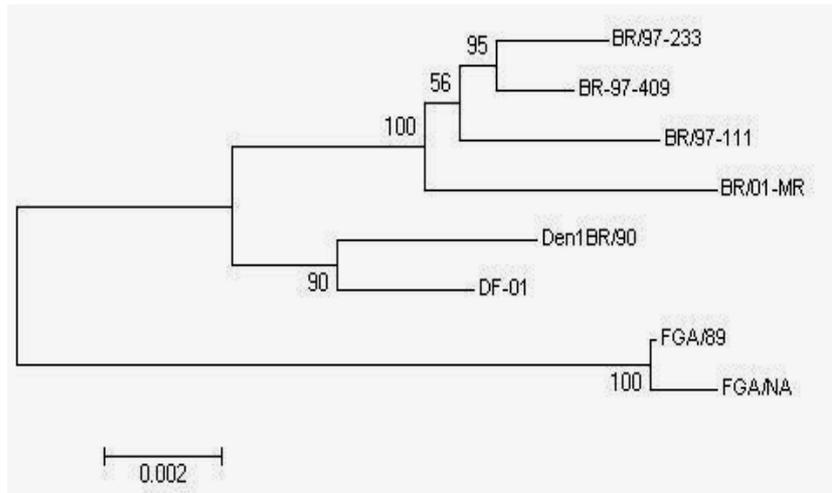
**Tabela 6:** Resultado do programa ClustalW, estimando a homologia do DF-01 com os demais isolados DENV-1 do Brasil.

|       | BR/97-233 | BR/97-409 | BR/97-111 | BR-01MR | <b>Den1BR/90</b> | FGA/89 | FGA/na |
|-------|-----------|-----------|-----------|---------|------------------|--------|--------|
| DF-01 | 98        | 99        | 98        | 98      | <b>99</b>        | 98     | 97     |

**Tabela 7:** Análise das substituições encontradas (aminoácidos) entre o isolado DF-01 e Den1BR/90.

| <b>Posição</b> | <b>Região</b> | <b>Den1BR/90</b> | <b>DF-01</b> |
|----------------|---------------|------------------|--------------|
| 1428           | E             | T                | A            |
| 1490           | E             | R                | G            |
| 1616           | E             | N                | S            |
| 1940           | E             | S                | N            |
| 1998           | E             | E                | G            |
| 3277           | NS1           | I                | V            |

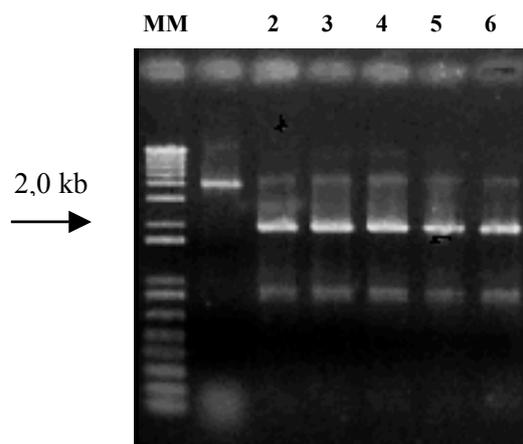
Uma análise filogenética foi realizada utilizando o método de Neighbor Joining, através do programa Mega 3.0 (Figura 14) em que os sete isolados foram agrupados de acordo com a identidade. A árvore resultante dessa análise demonstrou mais proximidade do isolado DF-01 com o Den1BR/90.



**Figura 14:** Árvore filogenética com resultados de alinhamentos de DENV-1 brasileiros.

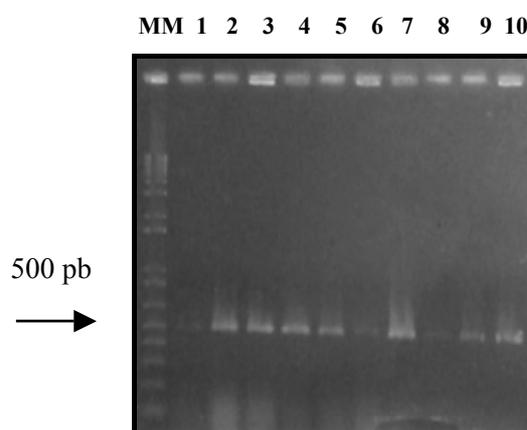
## 6.2. Clonagem e subclonagem do ME

Os fragmentos de PCR específicos (Figura 15) possuindo 2,0 kb foram isolados com o auxílio de um bisturi e o DNA amplificado foi purificado da agarose. Após a clonagem no vetor pUC 19 (Figura 10), a região do inserto foi seqüenciada para confirmar a integridade da sua ORF.



**Figura 15:** Fotografia do gel de agarose evidenciando os produtos amplificados correspondentes à região ME (2,0 kb). Poço MM (Marcador Molecular 1kb Plus Ladder); Poços 2 a 6 (Isolado DF-01 (PCR – DENV-1) tamanho 2,0 kb).

O cDNA foi digerido com as endonucleases de restrição *Eco* RI e *Sal* I artificialmente inseridos nas extremidades dos "primers" (Material & Métodos) e clonados em pPICZ $\alpha$  A (Figura 11) para possibilitar a expressão protéica em levedura. Sua inserção no gene foi confirmada com tratamentos usando as mesmas endonucleases de restrição e conseqüentemente ocorreu a liberação do fragmento de DNA do tamanho adequado. Um clone contendo o gene M-E em pPICZ $\alpha$  A (pPIC-ME) foi selecionado, multiplicado e linearizado com a enzima *Pme* I. A transformação do pPIC-ME na forma linear é recomendada no protocolo do fabricante (Invitrogen). Dez  $\mu$ g de pPIC-ME foram transformadas utilizando as condições descritas no Material & Métodos. Dez colônias foram obtidas na transformação e sua inserção do gene foi confirmada com a técnica de PCR de colônia (Figura 16).

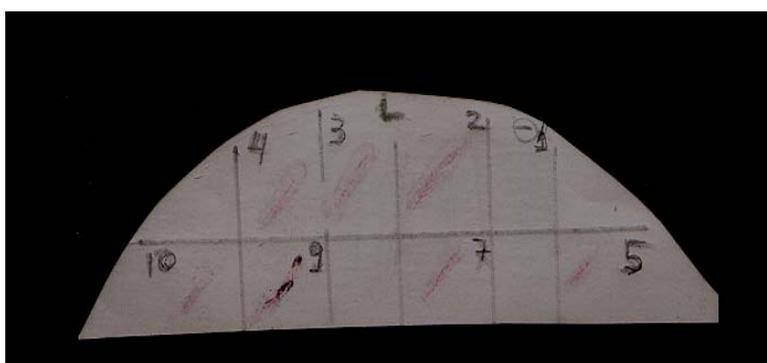


**Figura 16:** Fotografia do gel de agarose evidenciando os produtos amplificados por PCR colônia correspondentes à região pPIC-M (500 pb). Poço MM (Marcador Molecular 1kb Plus Ladder); Poços 1 a 10 tamanho 500 pb.

Após a confirmação de inserção do gene (transformação) (PCR de colônia (Figura 15)) a primeira seleção foi feita com a técnica ELISA de colônia. Os clones positivos (2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10) foram selecionados e transferidos para uma placa contendo meio MMH (5.1.2.11.), e incubados em estufa a 28° C por 3 dias.

Após o crescimento das colônias, foi realizada a expressão de proteínas recombinantes através da indução com metanol (5.2.10.). Decorridas às 72 horas da indução, a placa foi separada e as colônias foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Hybond C-Extra, Amersham Biosciences) para a realização do teste.

O resultado do ELISA de colônia utilizando o anticorpo anti-His-tag encontra-se na Figura 17. Todas as sete colônias mostraram sinais positivos fracos. O teste incluiu um controle negativo e nota-se que não houve reação de cor (devido à ausência de antígenos específicos para os anticorpos utilizados) no controle negativo (poço nº 1) confirmando portanto a especificidade da reação. Assim sendo, foi concluído que houve expressão específica do gene inserido em levedura.



**Figura 17:** Membrana apresentando resultado positivo (colônias 2, 4, 5, 7, 9 e 10) e negativo (colônia 1) do método Elisa de colônia, clones DF-01 (DENV-1) pPICZ $\alpha$  A-ME.

## 7.DISSCUSSÃO

O primeiro isolado brasileiro totalmente seqüenciado foi o FGA/na (Santos *et al.*, 2000) o isolado brasileiro Den1BR/90 foi utilizado como referência para a obtenção do sorotipo DENV-1 pertencente a epidemias na América do Sul (Després *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2000). Para Santos (2002 a) os isolados de DENV-1 recentemente isolados do Brasil, divergiram do isolado Den1BR/90.

O isolado Den1BR/90 foi isolado de um homem adulto com FCD durante a epidemia de Dengue na cidade do Rio de Janeiro no ano de 1990, o isolado FGA/89 foi obtido na Guiana Francesa e foi coletado também de um paciente com FCD no ano de 1989 (Deprés *et al.*, 1993).

Há uma grande evidência de que a diversidade genética em DENV foi gerada por recombinação, embora esse processo não seja totalmente entendido (Tolou *et al.*, 2001; Uzcategui *et al.*, 2001), o processo de recombinação dos genomas do Dengue é raro, especialmente entre os quatro sorotipos que diferem substancialmente nas seqüências (Holmes & Burch, 2000).

Análises filogenéticas de DENV-1 (América do Sul) sugerem que Den1BR/90 é descendente de um único recombinante produzido por mudanças genéticas entre os isolados da Jamaica DENV-4 e Singapura DENV-1, portanto as seqüências parentais mais próximas para os diferentes segmentos recombinantes (Holmes & Burch, 2000).

Até o presente momento, nenhuma seqüência de isolados do Distrito Federal-DF está disponível em literatura. Com essa motivação foi realizado o seqüenciamento do genoma completo do DENV-1 do DF (isolado de 2001, nº 01021093 (DF-01)).

O isolado deste estudo foi obtido no LACEN-DF, no ano de 2001 na cidade de Brasília-DF de uma epidemia em que o paciente apresentou quadro de FHD.

Uma análise foi feita utilizando como base as seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foram observadas seqüências completas do genoma do DENV-1 de sete isolados brasileiros (BR/97-233; BR/97-409; BR/97-111; BR/01-MR; Den1BR/90; FGA/89; FGA/na). Estes isolados correspondem às regiões que foram coletados, bem como os Estados do Brasil que apresentaram a epidemia.

Após o seqüenciamento os dados foram comparados e foi estimada a identidade entre esses isolados. Concluiu-se que o isolado DF-01 deste trabalho possui maior identidade (99%) com o isolado do RJ (Den1BR/90) pelo programa ClustalW. Analisando as seqüências alinhadas observou-se que o DF-01 possuía seis mutações de aminoácidos no total comparando com isolado Den1BR/90 (Tabela 6), devido a substituições ao longo do genoma do DENV principalmente da proteína estrutural E (cinco mutações) e da proteína não-estrutural NS1 (uma mutação).

Visto que foram observadas substituições de nove aminoácidos específicos entre os isolados BR/97 e BR/01, indicando que ocorreu uma evolução do DENV-1 no Brasil *in situ* (Santos *et al.*, 2002 a).

Observando a tabela 6, uma análise também foi realizada para na posição 1428 o aminoácido T (Treonina) é um aminoácido não carregado, polar e hidrofílico, comparando com a substituição observada A (Alanina), esse aminoácido é hidrofóbico pertencente a uma classe não-polar e alifática. A mutação observada entre esses aminoácidos é direta, cuja substituição é do tipo Transição em que a Purina (A) foi substituída por outra Purina (G) (Schrank *et al.*, 2000).

Na posição 1490 o aminoácido R (Arginina) é um aminoácido básico carregado positivamente, hidrofílico, comparando com a substituição observada G (Glicina), esse aminoácido é hidrofóbico pertencente a uma classe não-polar e alifática. A mutação observada entre esses aminoácidos é direta, cuja substituição é do tipo Transversão em que a

Pirimidina (C) foi substituída por uma Purina (G) (Schrank *et al.*, 2000).

Na posição 1616 o aminoácido N (Asparagina) é um aminoácido não carregado, polar e hidrofílico, comparando com a substituição observada S (Serina), esse aminoácido pertence a mesma classe do N. A mutação observada entre esses aminoácidos é direta, cuja substituição é do tipo sinônima de sentido trocado em que o códon especifica aminoácidos semelhantes, portanto, não alteram a função da proteína (Schrank *et al.*, 2000).

Na posição 1940 o aminoácido S (Serina) é um aminoácido não carregado, hidrofílico, comparando com a substituição observada N (Asparagina), esse aminoácido pertence a mesma classe do S. A mutação observada é idêntica à da posição 1616.

Na posição 1998 o aminoácido E (Glutamato) é um aminoácido carregado negativamente, portanto são ácidos, comparando com a substituição observada G (Glicina). Esse aminoácido é hidrofóbico pertencente a uma classe não-polar e alifática. A mutação observada entre esses aminoácidos é direta, cuja substituição é do tipo Transição em que a Purina (A) foi substituída por outra Purina (G) (Schrank *et al.*, 2000).

Na posição 3277 o aminoácido I (Isoleucina) é um aminoácido não polar, alifático e hidrofílico, comparando com a substituição observada V (Valina), esse aminoácido pertence a mesma classe de I (Nelson & Cox, 2005). A mutação observada entre esses aminoácidos é direta, cuja substituição é do tipo sinônima de sentido trocado em que o códon especifica aminoácidos semelhantes, portanto, não alteram a função da proteína (Schrank *et al.*, 2000).

Deparando-se com a situação em que o isolado do DF (DF-01) foi coletado no ano 2001 e o genoma que apresentou a maior identidade (Den1BR/90) foi isolado no ano de 1990, no Rio de Janeiro, seis mutações foram observadas, infelizmente não possuímos resultados suficientes para o estudo da epidemiologia molecular e evolução do DENV. A velocidade de mutação do Dengue e suas divergências genéticas com outras seqüências do DENV, servem de estímulo para futuras pesquisas, buscando o conhecimento e monitoramento dos DENV

circulantes no DF.

Durante a década passada, expressões bem sucedidas da proteína E do DENV foram relatadas em diversos sistemas de vetores. Alguns estudos demonstram que a proteína recombinante E, expressada em *E. coli* possui muitos dos epitopos neutralizantes presentes no DENV. Estes resultados sugerem que a proteína recombinante E expressa em *E. coli* fornecerá um efetivo antígeno como reagente no diagnóstico da doença (Sugrue *et al.*, 1997 a). Neste estudo foi demonstrado que as proteínas estruturais do DENV expressadas em *P. pastoris* foram processadas em uma maneira similar àquela na célula infectada por vírus, essas proteínas foram conduzidas para a formação de partículas virais (Virus-like particles, VLPs) como o vírus naturalmente produz (Sugrue *et al.*, 1997 a).

O sistema de expressão neste trabalho foi diferenciado dos demais publicados, sendo a indução feita por sistema ELISA de colônia. O resultado da ELISA de colônia demonstrou que as colônias estricadas em meio rico, apresentaram proteínas recombinantes ME do DENV-1, pela reação de cor púrpura de tetrazolium. Apesar de que, este método não estima a quantidade de proteína expressada de cada clone, a proteína ME do nosso trabalho apresentou pouca quantidade. Há duas possibilidades prováveis para esse fato, uma baixa indução devido ao ambiente não favorável (Placa) ou uma baixa capacidade dos clones para a expressão. Uma terceira possibilidade seria a degradação pós-incubação, ocorrendo um acúmulo de proteína, principalmente do organismo *P. pastoris*.

## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, M.L. Dengue. Revisão, **Instituto Adolfo Lutz**; v. 56, p. 27-45, 1996.

BLOK, J. *et al.* NS1 gene sequences from eight dengue-2 viruses and their evolutionary relationships with other dengue-2 viruses. **Archives of Virology**, v. 118, p. 209-223, 1991.

BRAY, M.; LAI, C-J. *Dengue virus* premembrane and membrane proteins elicit a protective immune response. **Virology**, v. 185, p. 505-508, 1991.

BRISENO, G.B. *et al.* Potential risk for dengue hemorrhagic fever: The isolation of serotype dengue-3 in Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, p.133-135, 1996.

CHAMBERS, T.J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHAN, L.C.L. *et al.* Production of the baculovirus-expressed dengue virus glycoprotein NS1 can be improved dramatically with optimised regimes for fed-batch cultures and the addition of the insect moulting hormone, 20-Hydroxyecdosone. **Journal of Virological Methods**, v. 105, p. 87-98, 2002.

CHASSY, B.M.; FLICKINGER, J.L. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. **FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology letters**, v. 44, p. 17-177, 1987.

CHEN, Y. *et al.* Expression and Characterization of Glycosylated and Catalytically Active Recombinant Human  $\alpha$ -Galactosidase. **A Produced in *Pichia pastoris* Protein Expression and Purification**, v. 20, p. 472–484, 2000.

CREGG, J.M; HIGGINS, D.R. Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Canadian Journal of Botany Supplement**, v. 73, p. 5981-5987, 1995.

DESPRÉS, P.; FRENKIEL, M.P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type 1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, v. 196, p. 209-219, 1993.

FALGOUT, B.; MARKOFF, L. Evidence that Flavivirus NS1-NS2A Cleavage Is Mediated by a Membrane-Bound Host Protease in the Endoplasmic Reticulum. **Journal of Virology**, v. 69, p. 7232–7243, 1995.

FERREIRA, N.; BARBOSA, M.D.G.V.; ALECRIM, W.D. Registration of the occurrence of *Aedes albopictus* in an urban zone in Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 674-675, 2003.

FIGUEIREDO, L.T.M.; BATISTA, W.C.; IGARASHI, A. Detection and identification of dengue virus isolates from Brazil by a simplified reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) method. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 88-97, 1997.

FLAMAND, M. *et al.* Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **Journal of Virology**, p. 6104–6110, 1999.

FUNASA, Biologia dos vetores. 2001. Disponível em: <[http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/Dengue/ipcv\\_002.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/Dengue/ipcv_002.pdf)>. Acesso em: 03 ago. 2005.

FUNASA, Dengue clássica: Dengue aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. 2002. Disponível em : <[http://darwin.futuro.usp.br/site/doprofessor/cartilha\\_dengue.pdf](http://darwin.futuro.usp.br/site/doprofessor/cartilha_dengue.pdf)>. Acesso em: 03 ago. 2005.

FUNASA. 2003 a. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/PDF/GVE0504>>. Acesso em: 03 ago. 2005.

FUNASA. 2003 b. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/>>. Acesso em: 03 ago. 2005.

FUNASA – Vigilância Sanitária. 2003 c. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/epi/dengue/dengue0.htm>>. Acesso em: 03 ago. 2005.

FUNASA, 2005. Disponível em: <[https://sis.funasa.gov.br/dw/dm01/menu\\_p/0201.htm](https://sis.funasa.gov.br/dw/dm01/menu_p/0201.htm)>. Acesso em: 20 set. 2005.

GOMES, A.C. *et al.* Anthropophilic activity of *Aedes aegypti* and of *Aedes albopictus* in area under control and surveillance. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 2, 2005.

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

GUBLER, D.J.; TRENT, D.W. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. **Infectious Agents and Disease**, v. 2, p. 383-393, 1993.

GUBLER, J.D.; CLARK, G.G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, p. 55-7, 1995.

GUBLER, D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science**, v. 288, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S.B. & MARCHETTE, N.J. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 5-11, 2003.

HENCHAL, E.A. *et al.* Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of Dengue-2 virions using monoclonal antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 1, p. 162-169, 1985.

HOLMES, E.C.; WOROBEY, M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 405-409, 1999.

HOLMES, E.C.; BURCH, S.S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 74-77, 2000.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **Journal of General Virology**, v. 40, p. 531-544, 1978.

KINNEY, R.M. *et al.* Construction of infectious cDNA clones for Dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuation vaccine derivative, strain PDK-53. **Virology**, v. 230, p. 300-308, 1997.

LIMA, J.B.P.; CUNHA P. da, M.; CARNEIRO da S.J.R. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, p. 329-333, 2003.

LIMA, J.B.P.; MELO, N.V.; VALLE, D. Persistence of Vectobac WDG and Metoprag S-2G against *Aedes aegypti* larvae using a semi-field bioassay in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 1, 2005 a.

LIMA, J.B.; MELO, N.V.; VALLE, D. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 3, 2005 b.

MANGADA, M.N.; IGARASHI, A. Sequence of terminal non-coding regions from four dengue-2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. **Virus Genes**, v. 14, p. 5-12, 1997.

MANGADA, M.N.; IGARASHI, A. Molecular and *in vitro* analysis of eight dengue-2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. **Virology**, v. 244, p. 458-466, 1998.

MARTINS, F.S.V.; SETÚBAL, S. **Dengue**: diagnóstico e tratamento. Informe Técnico 3. Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, 1990.

MCBRIDE, J.H.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections, pathogenesis and epidemiology. **Microbes and Infection**, v. 2, p.1041-1050, 2000.

MEN, R. *et al.* Dengue type 4 virus mutants containing deletion in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremic pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. **Journal of Virology**, v. 70, p. 3930-3937, 1996.

MIAGOSTOVICH, M.P. *et al.* Molecular epidemiology of den-2 in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 625-626, 1998.

MONATH, T.P. Dengue: The risk to developed and developing countries. **PNAS (Proceedings of the National Academic Sciences of the United States of America)**, v. 91, p. 2395-2400, 1994 a.

MONATH, T.P. Yellow Fever and Dengue - the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. **Virology**, v. 5, p.133-145, 1994 b.

MONDINI, A. *et al.* Spatial analysis of dengue transmission in a medium-sized city in Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 444-451, São Paulo, 2005.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman and Company. 2005, 78-79 p.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SCHATZMAYR, H.G. Molecular epidemiology of Dengue viruses in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 205-211, 2000.

PINHEIRO, F.P.; CORBER, S.J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. **World Health Stat**, p. 161-169, 1997.

REGENMORTEL, M.H.V. *et al.* **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. 17. ed. New York: Academic Press. 2000, 859-864 p.

RICO-HESSE, R. *et al.* Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, p. 244-251, 1997.

SAMBROOK, J.; ROUSSELL, D.W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SANTOS, C.N.D. *et al.* Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virology**, v. 274, p. 292-308, 2000.

SANTOS, C.N.D. *et al.* Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. **Virus Research**, v. 90, p.197-205, dez. 2002 a.

SANTOS, N.S.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan S.A. 2002 b.

SCHATZMAYR, H.G. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95 (Supl I), p. 179-181, 2000.

SCHRANK, A. *et al.* **Biologia Molecular Básica**. 2nd. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto Ltda. 2000.

SHU, P.Y. *et al.* Comparison of Capture Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific IgG ELISA for Differentiation of Primary and Secondary Dengue Virus Infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 622-630, 2003.

SIQUEIRA, J.B. *et al.* Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 646-651, 2004.

STARAPOLI, I. *et al.* Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. **Vaccine**, v. 15, p. 1946-1954, 1997.

SUGRUE, R.J. *et al.* The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Journal Virology Methods**, v. 69, p.159-169, 1997 a.

SUGRUE, R.J. *et al.* Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1861-1866, 1997 b.

TOLOU, H.J. *et al.* Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. **Journal of General Virology**, v. 82, p.1283-1290, 2001.

UNDP World Bank – WHO: special programme for research and training in tropical diseases. 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/dengue/direction.htm>>. Acesso em: 02 ago. 2005.

UZCATEGUI, N.Y. *et al.* Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ evolution and recombination. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2945-2953, 2001.

WANG, E. *et al.* Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. **Journal of Virology**, p. 3227-3234, v. 74, n. 7, 2000.

WEI, HY. *et al.* Secreted expression of dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, vol. 109, p. 17-23, 2003.

WHO. Dengue prevention and control. 2002 a

Ed. Geneva. Disponível em: <[http://www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA55/ea5519.pdf](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA55/ea5519.pdf)>.

Acesso em: 30 jul. 2005.

WHO. Dengue and Dengue haemorrhagic fever. 2002 b. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 03 ago. 2005.

WHO, 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso

em: 20 set. 2005.

## 9. APÊNDICE

Apêndice 1: Sequência completa do isolado (DF-01) DENV-1, deste estudo.

```
1 AGTTGTTAGT CTACGTGGAC CGACAAGAAC AGTTTCGAAT CGGAAGCTTG
51 CTTAACGTAG TTCTAACAGT TTTTATTAG AGAGCAGATC TCTGATGAAC
101 AACCAACGGA AAAAGACGGG TCGACCGTCT TTCAATATGC TGAAACGCGC
151 GAGAAACCGC GTGTCAACTG GTTACAGTT GCGAAGAGA TTCTCAAAG
201 GATTGCTTTC AGGCCAAGGA CCCATGAAAT TGGTGATGGC TTTCATAGCA
251 TTTCTAAGAT TTCTAGCCAT ACCCCCAACA GCAGGAATTT TGGCTAGATG
301 GAGCTCATTC AAGAAGAATG GAGCAATCAA AGTGTTACGG GTTTTCAAAA
351 AAGAGATCTC AAGCATGCTG AACATAATGA ACAGGAGGAA AAGATCCGTG
401 ACCATGCTCC TCATGCTGCT GCCCACAGCC CTGGCGTTCC ATTTGACCAC
451 ACGAGGGGGA GAGCCACACA TGATAGTTAG TAAGCAGGAA AGAGGAAAGT
501 CACTCTTGTT TAAGACCTCT GCAGGTGTCA ATATGTGCAC TCTCATTGCG
551 ATGGATTTGG GAGAGTTATG TGAGGACACA ATGACCTACA AATGCCCCCG
601 GATCACTGAG GCGGAACCAG ATGACGTTGA CTGCTGGTGC AATGCCACAG
651 ACACATGGGT GACCTATGGG ACGTGTTCCT AAACCGGCGA ACACCGACGA
701 GACAAACGTT CCGTGGCACT GGCCCCACAC GTGGGACTCG GTCTAGAAAC
751 AAGAACTGAA ACATGGATGT CTTCTGAAGG CGCCTGGAAA CAAATACAAA
801 AAGTGAGAC TTGGGCTTTG AGACACCCAG GATTACGGT GATAGCCCTT
851 TTTTATGAC ATGCCATAGG AACATCCATC ACTCAGAAAG GGATCATTTT
901 CTTTTGCTG ATGCTGGTGA CACCATCAAT GGCCATGCGA TGCCTGGGAA
951 TAGGCAACAG AGACTTCGTC GAAGGACTGT CAGGAGCAAC GTGGGTAGAC
1001 GTGGTATTGG AGCATGGAAG CTGCGTCACC ACCATGGCAA AAAATAAACC
1051 AACATTGGAC ATTGAACCTT TGAAGACGGA GGTCACGAAC CCTGCCGTCT
1101 TGCGCAAAC GTGCATTGAA GCCAAAATAT CAAACACCAC CACCGATTCA
1151 AGATGTCCAA CACAAGGAGA GGCTACACTG GTGGAAGAAC AAGACGCGAA
1201 CTTTGTGTGT CGCCGAACGT TTGTGGACAG AGGCTGGGGT AATGGCTGCG
1251 GATTATTCGG AAAAGGAAGC CTATTGACGT GTGCCAAGTT CAAGTGTGTG
1301 ACAAACCTAG AAGGAAAGAT AGTTCAATAT GAAAACCTAA AATATTCAGT
1351 GATAGTCACC GTCCACACTG GGGATCAGCA CCAGGTGGGA AACGAGACTA
1401 CAGAACATGG AACAATTGCA ACCATAACAC CTCAAGCTCC CACGTGGGAA
1451 ATACAGCTGA CTGACTACGG AGCCCTCACA TTGGACTGTT CACCTAGAAC
1501 AGGGCTGGAC TTTAATGAGA TGGTGCTATT GACAATGAAA GAAAATCAT
1551 GGCTTGTTCA CAAACAATGG TTTCTAGACT TACCACTGCC TTGGACTTCG
1601 GGGCTTCAA CATCCCAAGA GACTTGGAAC AGACAAGATT TGCTGGTCAC
1651 ATCAAGACA GCTCATGCAA AGAAACAGGA AGTAGTCGTA CTGGGATCAC
1701 AAGAAGGAGC AATGCACACC GCGTTGACTG GGGCGACAGA AATCCAGACG
1751 TCAGGAACGA CAACAATCTT TGCAGGGCAC CTGAAATGCA GACTAAAAAT
1801 GGATAAACTG ACTTTAAAGG GGACGTCATA TGTGATGTGC ACAGGCTCAT
1851 TTAAGCTAGA GAAGGAAGTG GCTGAGACCC AGCATGGAAC TGTTCAGTG
1901 CAGGTCAAAT ACGAAGGAAC AGATGCGCCA TGCAAGATCC CCTTTTCGAC
1951 CCAAGATGAG AAAGGAGTGA CCCAGAATGG GAGATTGATA ACAGCCAATC
2001 CCATAGTTAC TGACAAAGAA AAACCAGTCA ACATTGAGAC AGAACCACCT
2051 TTTGGTGAGA GCTACATCGT GGTAGGGGCA GGTGAAAAAG CTTTGAAACT
2101 AAGCTGGTTC AAGAAAGGAA GCAGCATAGG GAAAATGTTC GAAGCAACCG
2151 CCCGAGGAGC ACGAAGGATG GCTATCCTGG GAGACACCGC ATGGGACTTT
2201 GGCTCTATAG GAGGAGTGTT CACATCTGTG GGAAAATTGG TACACCAGGT
2251 TTTTGGAACC GCATATGGTG TTCTGTTTCT CGGTGTTCCT TGGACCATGA
2301 AAATAGGAAT AGGGATTCTG CTGACATGGT TGGGATTAAT TTCAAGGAGC
2351 ACGTCACTTT CGATGACGTG CATTGCAGTT GGCATGGTTA CACTGTACCT
2401 AGGAGTCATG GTTCAAGCGG ACTCGGGATG TGTAATCAAC TGGAAGGGCA
2451 GAGAACTCAA ATGTGGAAGT GGCATTTTTG TCACTAATGA AGTCCACACT
2501 TGGACAGAGC AATACAAATT CCAGGCTGAC TCCCCAAAAA GACTGTCAGC
2551 AGCCATTGGA AAGGCATGGG AGGAGGGCGT GTGTGGAATT CGATCAGCCA
```

2601 CGCGTCTTGA GAACATCATG TGGAAAGCAAA TATCAAATGA ATTGAACCAC  
2651 ATTCTACTTG AAAATGACAT GAAATTCACA GTGGTTGTAG GAGATGCTAA  
2701 TGGAAATTTTG GCCCAAGGGA AAAAAATGAT TAGGCCACAA CCCATGGAAC  
2751 ACAAATACTC ATGGAAAAGC TGGGGAAAAG CTAAAATCAT AGGAGCAGAC  
2801 ATACAAAATA CCACCTTCAT CATCGACGGC CCAGATACTC CAGAATGCCC  
2851 CGATGAACAA AGAGCGTGGA ACATTTGGGA AGTTGAGGAC TATGGGTTTG  
2901 GAATTTTCAC GACAAACATA TGGCTGAAAT TGCCTGACTC CTACACCCAA  
2951 ATGTGTGACC ACCGGCTAAT GTCAGCTGCC ATCAAGGACA GCAAGGCAGT  
3001 CCATGCTGAC ATGGGGTACT GGATAGAAAAG TGAAGAAGAAC GAAACCTGGA  
3051 AGCTGGCGAG AGCCTCCTTC ATAGAAGTCA AGACATGCAT CTGGCCGAAA  
3101 TCCCACACTC TATGGAGTAA TGGAGTTTGT GAAAGTGAAA TGATAATCCC  
3151 AAAGATATAT GGAGGACCAA TATCTCAGCA CAACTACAGA CCAGGTATT  
3201 TCACACAAAC AGCAGGGCCA TGGCACCTAG GCAAGTTGGA ATTGGATTTT  
3251 GACTTGTGTG AAGGCACCAC AGTTGTGTGT GATGAACATT GTGGAATCG  
3301 AGGTCCATCT CTCAGAATA CAACAGTCAC AGGAAAGATA ATCCATGAAT  
3351 GGTGTTGCAG ATCCTGCACG CTACCCCTTAC TACGGTTCAG AGGAGAAGAC  
3401 GGATGTTGGT ATGGCATGGA AATCAGACCA GTTAAGGAGA AGGAGGAGAA  
3451 CCTAGTTAGG TCAATGGTCT CTGCAGGGTC AGGAGAAGTG GACAGTTTTT  
3501 CATTAGGAAT ACTATGCGTA TCAATAATGA TTGAAGAAGT GATGAGATCC  
3551 AGATGGAGTA GAAAGATGCT GATGACTGGA ACACTGGCTG TTTTCTCCT  
3601 TCTTATAATG GGACAACCTGA CATGGAATGA TCTGATTAGG TTATGCATCA  
3651 TGGTTGGAGC TAATGCTTCA GACAAGATGG GGATGGGAAC AACGTACCTA  
3701 GCCTTGATGG CTACTTTCAA AATGAGACCA ATGTTGCTG TTGGGCTATT  
3751 ATTTGCGAGA CTAGCATCCA GAGAAGTCT TCTTCTCAG ATTGGATTAA  
3801 GCCTGGTGGC ATCCGTGGAG CTACCAAAT CTTTGGAGGA GCTAGGGGAT  
3851 GGACTTGCAA TGGGTATCAT GATGTTAAAA TTATTGACTG AATTTAGCC  
3901 ACACCACTTA TGGACCACCT TACTGTCTTT GACATTTATC AAAACAACCTC  
3951 TTTTATTGGA TTATGCATGG AAGACAACGG CTATGGTACT GTCATCGTA  
4001 TCTCTCTTTC CTTTATGCCT GTCTACGACC TCCCAAAAA CAACATGGCT  
4051 TCCGGTGCTG TTAGGATCTT TTGGATGCAA ACCATTAACC ATGTTTCTTA  
4101 TAACAGAAAA CAAAATCTGG GGAAGGAAAA GTTGGCCCTT CAATGAAGGA  
4151 ATTATGGCTA TTGGAATAGT CAGCATTTCTA CTAAGTTCAC TCTCAAAAA  
4201 TGATGTGCCG TTGGCCGGCC CACTAATAGC TGGAGGCATG CTAATAGCAT  
4251 GTTATGTCAT ATCCGGAAGC TCAGCCGATT TATCATTGGA GAAAGCGGCT  
4301 GAGGTATCCT GGGAAGAAGA AGCAGAACAC TCCGGTACCT CACACAACAT  
4351 ATTAGTAGAG GTTCAAGATG ATGGAGCTAT GAAAATAAAA GATGAAGAGA  
4401 GGGATGACAC ACTCACTATA CTCCTTAAAG CAACTTTGCT GGCAGTCTCA  
4451 GGAGTGTACC CAATGTCAAT ACCAGCAACT CTTTTTGTGT GGTATTTTTG  
4501 GCAGAAAAAG AAACAGAGAT CAGGAGTGTT ATGGGACACA CCCAGCCCTC  
4551 CGGAAGTGGA AGGAGCGGTT CTTGATGATG GCATTTATAG AATCTTGCAA  
4601 AGAGGACTGT TGGGCAGGTC CCAAGTAGGA GTGGGAGTTT TCCAAGACGG  
4651 CGTGTTCAC ACAATGTGGC ACGTCACCAG GGGAGCTGTC CTTATGTACC  
4701 AAGGGAAGAG GCTGGAACCA AGCTGGGCCA GTGTCAAAAA GGACTTGATC  
4751 TCATATGGAG GAGGTTGGAG GTTTCAAGGA TCATGGAACA CAGGAGAAGA  
4801 AGTGCAGGTG ATAGCTGTTG AACCAGGAAA AAACCCAAA AATGTACAGA  
4851 CAACGCCGGG TACCTTCAAG ACTCCTGAAG GCGAAGTTGG AGCCATAGCT  
4901 CTAGATTTTA AACC CGGCAC ATCTGGATCT CCCATCGTGA GCAGAGAGG  
4951 AAAAAATAGTA GGTCTTTATG GAAATGGAGT GGTGACAACA AGTGGAACCT  
5001 ACGTCAGTGC CATAGCCCAA GCTAAAGCAT CACAGGAAGG GCCTCTACCA  
5051 GAGATTGAGG ACGAGGTGTT TAAGAAAAGA AACTTAACAA TAATGGACCT  
5101 CCATCCAGGA TCAGGAAAAA CAAGAAGATA TCTTCCAGCC ATAGTCCGTG  
5151 AGGCCATAAA AAGGAAACTG CGTACGTTAA TCTTGGCTCC CACAAGAGTT  
5201 GTCGCCTCTG AAATGGCAGA GGCCTCAAG GGAATGCCAA TAAGATATCA  
5251 GACAACAGCA GTGAAGAGTG AGCACACAGG AAGGGAGATA GTTGACCTCA  
5301 TGTGCCACGC CACTTTTACC ATGCGTCTCT TATCCCAGT GAGAGTTCCC  
5351 AATTACAACA TGATTATTAT GGATGAAGCA CATTTTACCG ATCCAGCCAG  
5401 CATAGCGGCC AGAGGGTACA TCTCAACCCG AGTGGGTATG GGTGAAGCAG  
5451 CTGCGATCTT TATGACAGCC ACTCCCCAG GATCGGTGGA GCCTTTTCCA

5501 CAGAGCAATG CAGTTATCCA AGATGAGGAA AGAGACATTC CTGAGAGATC  
5551 ATGGAATTCA GGCTACGACT GGATCACTGA TTTTCCAGGT AAAACAGTCT  
5601 GGTTTGTTC AAGCATTAAA TCAGGAAATG ACATTGCCAA CTGCTTAAGA  
5651 AAGAACGGAA AACGGGTAAT CCAATTGAGC AGAAAAACCT TTGACACTGA  
5701 GTACCAGAAA ACAAAAAACA ATGACTGGGA CTATGTTGTC ACAACAGACA  
5751 TTTCTGAAAT GGGGGCAAAT TTCCGGGCTG ACAGGGTAAT AGACCCAAGG  
5801 CGGTGCTTGA AACCGGTAAT ACTAAAAGAT GGTCCAGAGC GTGTTATTCT  
5851 AGCCGGACCG ATGCCAGTGA CTGTGGCCAG TGCTGCCCAA AGGAGAGGAA  
5901 GAATTGGAAG GAACCAGAAC AAGGAAGGTG ATCAGTATGT TTACATGGGA  
5951 CAGCCTTTAA ATAATGATGA GGATCACGCT CATTGGACAG AAGCAAAAAT  
6001 GCTCCTTGAC AATATAAACA CACCAGAAGG GATCATCCCA GCCCTCTTTG  
6051 AGCCAGAGAG AGAAAAGAGT GCAGCAATAG ACGGGGGGTA CAGACTGCGG  
6101 GGAGAAGCGA GGAAAACGTT CGTGGAGCTC ATGAGAAGAG GAGATCTACC  
6151 AGTTTGGCTA TCCTACAAAG TTGCCTCAGA AGGTTTCCAG TACTCCGACA  
6201 GAAGGTGGTG CTTTGATGGG GAAAGGAACA ACCAGGTGTT GGAGGAGAAC  
6251 ATGGACGTGG AGATCTGGAC AAAGGAAGGA GAAAGAAAGA AATTGCGACC  
6301 CCGCTGGTTG GATGCCAGAA CATACTCTGA TCCACTGGCC CTGCGCGAGT  
6351 TTAAAGAGTT TGCAGCAGGA AGAAGAAGTG TCTCAGGTGA CCTAATATTG  
6401 GAAATAGGGA AACTTCCACA ACATTTGACG CTAAGAGCCC AGAATGCTCT  
6451 GGATAACTTG GTCATGTTGC ACAATTCCGA ACAAGGAGGA AAAGCCTATA  
6501 GACATGCTAT GGAGGAACTA CCAGACACCA TAGAAACATT GATGCTCCTG  
6551 GCTTTGATAG CTGTGTTGAC TGGTGGAGTG ACGCTGTTCT TCCTATCAGG  
6601 AAAAGGTCTA GGGAAAACAT CCATTGGCTT GCTCTGTGTG ACGGCCTCAA  
6651 GCGCACTGTT ATGGATGGCC AGTGTGGAGC CCCATTGGAT AGCGGCCTCC  
6701 ATCATACTAG AGTTCTTTTT GATGGTGCTG CTCATTCCAG AGCCAGACAG  
6751 ACAGCGCACT CCACAGGACA ACCAGCTAGC ATATGTGGTG ATAGGTTTGT  
6801 TATTCATGAT ACTGACAGTG GCAGCCAATG AGATGGGATT ATTGGAACC  
6851 ACAAGAAAAG ACCTGGGGAT TGGCCATGTA GCCGCCGAAA ACCACCAACA  
6901 TGCTACAATG CTGGACGTAG ACCTACGTCC AGCTTCAGCC TGGACCTCT  
6951 ATGCAGTAGC CACAACAGTT ATCACTCCCA TGATGAGACA CACAATTGAA  
7001 AATACAACGG CAAACATTTT CTTGACAGCC ATTGCAAATC AGGCAGCTAT  
7051 ATTGATGGGA CTTGACAAGG GATGGCCAAT ATCGAAGATG GACATAGGAG  
7101 TTCCACTTCT CGCCTTAGGG TGCTATTCCC AGGTGAACCC ATTGACACTG  
7151 ACAGCGGCGG TGTTGATGTT AGTGGCTCAT TATGCCATAA TTGGACCAGG  
7201 ACTGCAAGCA AAGGCCACTA GAGAAGCTCA AAAAAGGACA GCGGCCGGAA  
7251 TAATGAAAAA TCCAACCGTA GACGGGATTG TTGCAATAGA CCTGGATCCT  
7301 GTGGTTTATG ATGCAAAATT TGAAAAACAG CTAGGCCAAA TAATGTTACT  
7351 GATACTTTGT ACATCACAGA TCCTCTTGAT GCGGACCACA TGGGCCTTGT  
7401 GTGAATCTAT CACACTGGCT ACTGGACCCC TGACCACTCT CTGGGAGGGA  
7451 TCTCCAGGAA AATTCTGGAA TACCACGATA GCAGTGTCCA TGGCAAACAT  
7501 CTTCAGGGGA AGTTATCTAG CAGGAGCAGG TCTGGCCTTC TCATTAATGA  
7551 AATCTTTAGG AGGAGGTAGG AGAGGTACGG GAGCTCAAGG GGAAACACTG  
7601 GGAGAGAAAT GGAAAAGACA GTTAAACCAA CTGAGCAAGT CAGAATTCAA  
7651 CACCTACAAA AGGAGTGGGA TTATGGAGGT GGACAGATCC GAAGCCAAG  
7701 AGGGACTGAA AAGAGGAGAA ACAACCAAAC ATGCAGTGTC GAGAGGAACA  
7751 GCCAACTGA GGTGGTTTGT GGAGAGGAAC CTCGTGAAAC CAGAAGGGAA  
7801 AGTCATAGAC CTCGGTTGTG GAAGAGGTGG CTGGTCATAT TATTGTGCTG  
7851 GGCTGAAGAA AGTCACTGAA GTGAAGGGAT ACACAAAAGG AGGACCTGGA  
7901 CATGAGGAAC CTGTCCCAAT GCGGACCTAT GGATGGAACC TAGTAAAGCT  
7951 ACACTCTGGA AAAGATGTAT TTTTTATGCC ACCTGAGAAA TGTGACACCC  
8001 TTCTGTGTGA TATTGGTGAG TCCTCTCCGA ATCCAACAT AGAAGAAGGT  
8051 AGAACGTTAC GTGTTCTAAA GATGGTGGAA CCATGGCTCA GAGGAAACCA  
8101 ATTCTGCATA AAAATCCTAA ATCCTTACAT GCCAAGTGTG GTAGAAACTC  
8151 TGGAGCAAAT GCAAAGAAAA CATGGAGGGA TGCTAGTGCG AAACCCACTC  
8201 TCAAGAAATT CCACCCATGA AATGTACTGG GTTTCATGTG GGACAGGAAA  
8251 CATTGTGTGCG GCAGTGAACA TGACATCCAG AATGTTACTG AATCGATTCA  
8301 CAATGGCTCA CAGGAAGCCA ACATATGAAA GAGACGTGGA CTTAGGCGCT  
8351 GGAACAAGAC ATGTGGCAGT GGAACCAGAG GTAGCCAACC TAGATATCAT

8401 TGGCCAGAGG ATAGAGAATA TAAAAAATGA ACACAAGTCA ACATGGCATT  
8451 ATGATGAGGA CAATCCATAC AAAACATGGG CCTATCATGG ATCATATGAG  
8501 GTCAAGCCAT CAGGATCAGC CTCATCTATG GTGAATGGAG TGGTGAGATT  
8551 GCTCACAAAA CCATGGGATG TTATCCCCAT GGTACACAAA ATAGCTATGA  
8601 CTGATAACCAC ACCCTTTGGA CAACAGAGGG TGTTTAAAGA GAAAGTTGAC  
8651 ACGCGCACAC CAAGAGCAAA ACGAGGCACA GCACAAATTA TGGAGGTGAC  
8701 AGCCAAGTGG TTATGGGGTT TCCTTTCCAG AAACAAAAAA CCCAGAATCT  
8751 GCACAAGAGA GGAGTTCACA AGAAAGGTTA GGTCAAACGC AGCAATAGGA  
8801 GCAGTGTTTCG TTGATGAAAA CCAATGGAAC TCAGCAAAAG AAGCAGTGGG  
8851 AGACGAAAGG TTTTGGGATC TCGTGCACAG AGAGAGGGAG CTTCATAAAC  
8901 AGGGAAAATG TGCCACGTGT GTCTACAACA TGATGGGGAA GAGAGAGAAA  
8951 AAATTAGGAG AGTTTGGAAA GGCAAAAGGA AGTCGTGCAA TATGGTATAT  
9001 GTGGCTGGGA GCACGTTTTT TGGAGTTCGA AGCCCTTGGC TTCATGAATG  
9051 AAGATCACTG GTTTAGTAGA GAGAATTCAC TCAGTGGAGT GGAAGGAGAA  
9101 GGACTGCACA AACTTGGATA CATACTCAGA GACATATCAA AGATTCCGGG  
9151 GGGAAATATG TATGCAGATG ATACAGCCGG ATGGGATACA AGAATAACAG  
9201 AGGATGATCT TCAGAATGAG GCTAAAATCA CTGACATCAT GGAGCCTGAA  
9251 CATGCTCTAT TGGCTACGTC AATTTTTAAG CTGACTTACC AAAATAAGGT  
9301 GGTGAGGGTG CAAAGACCAG CAAAAAATGG AACCGTGATG GATGTTATAT  
9351 CCAGACGTGA CCAGAGAGGA AGTGGACAGG TCGGAACTTA TGGCTTAAAT  
9401 ACTTTTACTA ATATGGAGGT CCAACTAATA AGACAAATGG AGTCTGAAGG  
9451 AATCTTTTTTA CCCAGCGAAT TGGAAACCCC CAATCTAGCT GAGAGAGTTC  
9501 TTGACTGGTT GGAAAAACAT GCGCCGAAA GGCTGAAAAG AATGGCAATC  
9551 AGCGGAGATG ATTGTGTAGT GAAACCAATT GATGACAGGT TCGCAACAGC  
9601 CTTAATAGCT CTGAATGACA TGGGAAAAGT AAGAAAAGAC ATACCGCAGT  
9651 GGGAACCTTC AAAAGGATGG AATGATTGGC AGCAAGTGCC TTTCTGTTCA  
9701 CACCATTTTC ACCAGTTGAT CATGAAGGAT GGGAGGGAAA TAGTGGTGCC  
9751 ATGCCGCAAC CAAGATGAAC TTGTGGGCAG GGCTAGAGTA TCACAAGGCG  
9801 CCGGATGGAG CCTGAGAGAA ACTGCTTGCC TAGGCAAGTC ATATGCACAA  
9851 ATGTGGCAGC TGATGTACTT CCACAGGAGA GACCTGAGAC TGGCGGCTAA  
9901 TGCTATCTGT TCAGCCGTCC CAGTTGATTG GGTCCCAACC AGCCGCACAA  
9951 CCTGGTCAAT CCATGCCAC CACCAATGGA TGACAACAGA AGACATGTTA  
10001 TCAGTGTGGA ATAGGGTTTG GATAGAGGAA AACCCATGGA TGGAGGACAA  
10051 AACTCATGTA TCCAGTTGGG AAGAAGTTCC ATACCTAGGG AAAAGGGGAA  
10101 ATCAATGGTG TGGATCCCTG ATAGGCTTGA CAGCGAGGGC CACCTGGGCC  
10151 ACCAACATAC AAGTAGCCAT AAACCAAGTG AGAAGGCTCA TCGGGAATGA  
10201 GAATTATCTA GATTACATGA CATCAATGAA GAGATTCAAG AATGAGAGTG  
10251 ATCCCGAAGG GGCACCTCTG TAAGTCAACA CACTCATGAA ATAAAGGAAA  
10301 ATAGAAGATC AAATAAAGCA AGAAGTCAGG CCAGATTAAG CCATAGTACG  
10351 GAAAGAGCTA TGCTGCCTGT GAGCCCCGTC CAAGGACGTA AAATGAAGTC  
10401 AGGCCGAAAAG CCACGGCTTG AGCAAGCCGT GCTGCCTGTG GCTCCATCGT  
10451 GGGGATGTAA AAACCCGGGA GGCTGCAACC CATGGAAGCT GTACGCATGG  
10501 GGTAGCAGAC TAGTGGTTAG AGGAGACCCC TCCCTAGACA TAACGCAGCA  
10551 GCGGGGCCCA ACACCATGGG AAGCTGTACC TTGGTGGTAA GGACTAGAGG  
10601 TTAGAGGAGA CCCCCGCAT AACAAACAAAC AGCATATTGA CGCTGGGAGA  
10651 GACCAGAGAT CCTGCTGTCT CTACAGCATC ATTCCAGGCA CAGAACGCCA  
10701 GCAATGGAAA TGGTGCTGTT GAATCAACAG GTTCT

**Seqüenciamento do genoma completo do *Dengue vírus* sorotipo 1 do DF e expressão de proteínas virais ME em *Pichia pastoris***

**FAGUNDES, L.S.<sup>1</sup>; NAGATA, T.<sup>1</sup>; TORRES, F.A.<sup>2</sup>; NOGUEIRA, E.F.<sup>1</sup>**

**<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília (UCB)**

**<sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília (UnB)**

**Correspondência com o autor. Endereço: UCB (Campus II - Pós- Graduação) SGAN  
Quadra 916, Módulo B, Av. W5 Norte, Brasília-DF – 70.790160, Brasil.**

**e-mail: leticialetts@gmail.com (Fagundes, L.S.<sup>1</sup>)**

## RESUMO

Pela análise de cinco isolados de DENV-1 do Brasil, primers específicos de oligonucleotídeos foram desenhados para clonagem e amplificação do genoma completo do DENV-1 autóctone do Distrito Federal nº 01021093 (DF-01). A amplificação do genoma completo foi estabelecida em duas regiões (extremidades de 5'- 6,8 kb e 3'- 5,0 kb) clonadas no vetor pCR4, para posterior seqüenciamento. A seqüência do isolado DF-01 foi analisado pelo programa "BlastN" e "ClustalW", onde o isolado deste estudo DF-01 apresentou maior identidade com o isolado Den1BR/90 (Isolado do Rio de Janeiro, 1990).

Com o objetivo final de fornecer o antígeno viral do Dengue para diagnóstico, as proteínas virais M (membrana) e E (envelope) foram sub-clonadas em vetor de expressão da levedura pPICZ $\alpha$  A (denominado pPIC-ME). Uma linhagem da *Pichia pastoris* (GS 115) foi transformada e sua integração foi confirmada por PCR. Os clones positivos foram selecionados e induzidos com metanol por 72 horas a 30° C e posteriormente as colônias foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C). Um ELISA de colônia foi realizado utilizando anticorpo específico anti-HisTag para o reconhecimento da proteína recombinante contendo a região HisTag e o anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado com fosfatase alcalina. Sete de 8 colônias apresentaram sinais positivos, confirmando a presença de proteínas recombinantes pela transformação do pPIC-ME.

**Palavra-chave:** *Dengue virus*, seqüenciamento do genoma e indução em *P. pastoris*

## INTRODUÇÃO

O vírus do Dengue (DENV) é um importante arbovirus (vírus transmitido por artrópode) que pertence à família *Flaviviridae*. O vírus é o agente causador da doença Dengue nos trópicos e subtropicais (Gubler, 1998). É causada por quatro sorotipos diferentes (DENV-1, 2, 3, e 4), que causa um spectrum de doenças variando de febre clássica do Dengue (FCD)

à febre hemorrágica do Dengue (FHD), que pode progredir a síndrome de choque do Dengue (SCD) e à morte (Santos *et al.*, 2000).

A distribuição do Dengue no mundo está representada sob a forma de 100 países endêmicos, distribuídos pelas Américas, sudeste da Ásia, sudeste oriental, norte das Ilhas Pacíficas, Pacífico ocidental, África e Mediterrâneo (UNDP, 2003). Até o ano de 2000, os casos de Dengue no Brasil foram causados pelos sorotipos 1 e 2 (Miagostovich *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2002). No Distrito Federal os casos positivos e confirmados de DENV, são na sua maioria autóctones (ou seja, da região em que a pessoa infectada reside) principalmente do DENV-1. Como o principal sorotipo circulante no Distrito Federal é do tipo 1, há a necessidade de acompanhamento e estudos epidemiológicos dos casos autóctones pois são endêmicos desta região.

O genoma do DENV é formado por uma fita simples positiva de RNA que codifica somente uma poliproteína processada em três proteínas estruturais: Capsídeo (C), pré-membrana (prM) (Flamand *et al.*, 1999) e envelope glicoprotéico (E) e sete proteínas não-estruturais (NS): NS1, NS2 A, NS2 B, NS3, NS4 A, NS4 B e NS5. Estudos demonstram a associação de patogenicidade e variabilidade com as proteínas prM, E, NS1, NS3 com regiões não codificadoras (Blok *et al.*, 1991; Men *et al.*, 1996; Kinney *et al.*, 1997; Mangada & Igarashi 1997 & 1998; Regenmortel *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002).

Sete seqüências completas dos genomas DENV-1 (BR/97-233; BR/97-409; BR/97-111; BR/01-MR; Den1BR/90; FGA/89; FGA/na) de isolados brasileiros estão depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Estes isolados correspondem aos Estados brasileiros Paraná, Rio de Janeiro e Pernambuco, portanto ainda não foi depositado o genoma completo do DENV-1 do Estado do Distrito Federal. E com esse intuito que o isolado DF-01 foi seqüenciado e analisado.

Com o intuito da obtenção de proteínas recombinantes virais para servirem como

substrato em kit de detecção para o DENV, proteínas virais do Dengue foram analisadas. A proteína E, prM e a NS1 foram as mais citadas na literatura (Flamand *et al.*, 1999; Shu *et al.*, 2003).

A proteína E é a principal proteína glicosilada do envelope exposta na superfície do vírion maduro do Dengue, é composta por 495 aminoácidos com peso molecular de 60 kDa. A proteína E pode se ligar a receptores na superfície da célula alvo, onde ocorrem fusões dos receptores com a membrana celular da célula alvo resultando em uma infecção viral (Halstead, 1988; Wei *et al.*, 2003).

Durante a década passada, expressões bem sucedidas da proteína E do DENV foram relatadas em diversos sistemas de vetores. A proteína E é conseqüentemente um antígeno importante para o desenvolvimento de uma vacina contra o DENV e para uso como reagente (antígeno) no diagnóstico de uma infecção DENV (Sugrue *et al.*, 1997 a & 1997 b; Wei *et al.*, 2003).

A fim estudar a estrutura e função da proteína M-E do DENV-1, fornecer uma potencial fonte para o desenvolvimento de uma vacina contra o DENV e obtenção de um antígeno DENV, foi utilizando o sistema heterólogo de expressão em levedura (*Pichia pastoris* (*P. pastoris*)) (Sugrue *et al.*, 1997 a & 1997 b) para a obtenção das proteínas recombinantes pPIC-ME. Os resultados da indução pelo sistema ELISA de colônia utilizando anticorpo específico (anti-His-Tag) e conjugado com fosfatase alcalina (anti-Mouse) demonstraram que houveram expressões específicas do gene inserido em levedura.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

**Obtenção das amostras de DENV** Uma amostra de DENV foi previamente inoculada em cultura de células de *Aedes albopictus* clone C6/36, cedidas pelo LACEN-DF (Laboratório

Central de Saúde Pública do Distrito Federal) (Igarashi, 1978), infectadas com o DENV-1, provenientes do Distrito Federal pertencente às epidemias de 1998 a 2002. O isolado de DENV-1 utilizado neste trabalho foi o de nº 01021093 (DF-01).

**Extração de RNA viral** Foi utilizado o Mini Kit-RNeasy (Qiagen) (conforme as instruções do fabricante) para a extração de RNA, sendo posteriormente aliquotados em microtubos de 1,5 mL e estocados a -80° C.

**RT-PCR** Para a obtenção do cDNA, uma reação de RT-PCR foi realizada com a enzima Super Script III RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen) (conforme recomendação do fabricante).

**Desenho dos primers específicos para o genoma do DENV-1** Para a determinação das seqüências dos primers a serem utilizados neste trabalho, buscou-se 5 seqüências dos genomas completos de isolados DENV-1 brasileiros (AF 311958 - BR/97-233 (Rio de Janeiro); AF 513110 - BR-01MR (Paraná); AF 311957 - BR/97-409 (Pernambuco); AF 311956 - BR/97-111 (Pernambuco); AF 226685 - Den1BR/90 (Rio de Janeiro)) depositadas no European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>) com a finalidade de amplificar duas grandes regiões (6,8 kb e 5,0 kb), totalizando os 11 kb totais do genoma do vírus.

DEN-5 Senso (CTACGTAGTTGTTAGTCTACGT)

DEN-5 Anti-senso (CCAATCCCCAGGTCTTTCTTTG)

DEN-3 Senso (GATGGTGCTGCTCATTCCAGA)

DEN-3 Anti-senso (GGGTTAATTAAGAACCTGTTGATTCAACAGCACCA)

Para o seqüenciamento do genoma completo do DENV-1, foram desenhados primers walking (Tabela 1) com a finalidade de amplificar o genoma completo do DENV-1.

**Tabela 1:** Desenho “primers walking”

| Primers       | Seqüências de Nucleotídeos | Primers       | Seqüências de Nucleotídeos |
|---------------|----------------------------|---------------|----------------------------|
| 1 Senso       | GGGCAGAGAACTCAAATGTGG      | 13 Senso      | ACTGCGGGGAGAAGCGAGGAAAA    |
| 2 Anti-senso  | TGGCACACGTCAATAGGCTTC      | 14 Anti-senso | CAGTCCTGGTCCAATTATGGCA     |
| 3 Senso       | TATCAAACACCACCACCATTC      | 15 Senso      | GCTATATTGATGGGACTTGAC      |
| 4 Anti-senso  | GTCACTCCTTTCTCATCTTGG      | 16 Anti-senso | GTGTATCCCTTCACTTCAGTG      |
| 5 Senso       | CCTGAAATGCAGACTAAAAATGG    | 17 Senso      | CCGAAGCCAAAGAGGGACTGAAA    |
| 6 Anti-senso  | CCACATGATGTTCTCAAGACGC     | 18 Anti-senso | TAGATGAGGCTGATCCTGATG      |
| 7 Senso       | GAACTCAAATGTGGAAGTGGCAT    | 19 Senso      | ATGTGGCAGTGGAACCAGAGGTA    |
| 8 Anti-senso  | TCCACAATGTTTCATCCACAAC     | 20 Anti-senso | CGGAATCTTTGATATGTCTCTG     |
| 9 Senso       | TGGAGGACCAATATCTCAGCAC     | 21 Senso      | GCAATATGGTATATGTGGCTGGG    |
| 10 Anti-senso | CATTTTGAAAGTAGCCATCAAGGC   | 22 Anti-senso | AGGCAAGCAGTTTCTCTCAGG      |
| 11 Senso      | GAAAGATGCTGATGACTG         | 23 Senso      | ATACCGCAGTGGAACCTTCA       |
| 12 Anti-senso | GAGTGTCTGCTTCTTCTTCCC      | 24 Anti-senso | TTACATCCCCACGATGGAG        |

**Primers para o gene ME e M do DENV-1** Dois pares de primers foram desenhados com a finalidade de amplificar a região ME com 2,0 kb.

ME Senso (CGGAATTCATTTGACCACACGAGGGG)

ME Anti-senso (ACGCGTCGACCGCTTGAACCATGACTCCTAG)

Para a amplificação do gene M foram desenhados dois pares de primers específicos para uma reação de PCR de colônia.

M-PVX-Asc Senso (AGGCGCGCCATGTTCCATTTGACCAC)

M-PVX Anti-senso (ACGCGTCGACTTATGATGGTGTACC)

**PCR** O cDNA do DENV-1 foi usado para a realização do PCR, onde dois pares de primers específicos foram utilizados para amplificação de dois grandes fragmentos (6,8 kb e 5,0 kb) de DNA do genoma do DENV-1. O cDNA também foi utilizado para uma amplificação específica em que um par de primers específicos foi utilizado para amplificar a região de proteínas não estruturais M e E (2,0 kb) e somente para amplificar a proteína M (reação de

PCR de colônia).

Foi realizada uma reação com volume final de 20 µL, contendo: 14,2 µL de água Milli-Q autoclavada, 2 µL tampão de 10X, 1 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,3 µL de primer **M-PVX-As** Senso (10 nM), 0,3 µL de primer **M-PVX** Anti-senso (10 nM), 2 µL de colônia (diluída em água Milli-Q) e 0,2 µl de enzima Taq (Pht) (DNA polimerase). A reação composta por 35 ciclos foi realizada sob as seguintes condições: Desnaturação inicial (94° C por 2 min), 2- 94° C por 30 seg., 3- 52° C por 1 seg., 4- 72° C por 2 min., 5- Repetir 34 X os itens 2, 3 e 4, 6- 72° C por 3 min. e 7- 12° C forever.

Para cada reação, adotou-se um ciclo com temperaturas e tempo variados, realizados no termociclador Mastercycler (Eppendorf). A especificidade das reações foi confirmada pelo tamanho dos fragmentos de PCR por eletroforese em gel de agarose.

**Clonagem dos fragmentos** Os fragmentos de interesse foram eluídos do gel de agarose utilizando o kit “Qiaex II Agarose Gel Extraction” (Quiagen) conforme recomendação do fabricante. O fragmento 6,8 kb e o fragmento 5,0 kb foram clonados separadamente no vetor pCR 4-TOPO.

O fragmento ME foi clonado no vetor pUC 19, e transformado em bactéria *E. coli* cepa DH5 α (Invitrogen) por eletroporação. Os clones foram selecionados e uma extração de plasmídeos através de kit para “Miniprep” (Promega) foi realizada conforme recomendação do fabricante. Os clones selecionados foram seqüenciados no seqüenciador automático Perkin Elmer ABI-Modelo 377. A clonagem em vetor pCR 4-TOPO foi seqüenciada utilizando 24 primers (Tabela 1) com a finalidade de sequenciar o genoma completo do DENV-1.

Após a confirmação da clonagem, o clone pUC 19-ME foi digerido com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Sal* I (Amersham Biosciences) e subclonado no vetor de expressão específico para o sistema *Pichia pastoris*, pPICZα A (Invitrogen).

**Análise computacional das seqüências do genoma completo (DF-01) DENV-1** As seqüências obtidas foram submetidas ao programa BlastN ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

**Trasformação em *P. pastoris*** O vetor clonado pPIC-ME foi linearizado com a enzima *Pme* I e transformado em *P. pastoris* (célula cepa GS 115 por eletroporação (Gene Pulser -Bio-Rad).

As células de levedura transformadas foram incubadas em meio YPDS ágar contendo antibiótico zeocina (100 mg/mL) a 30° C por 2-3 dias. As colônias resistentes à zeocina foram selecionadas pela técnica de PCR de colônia (Figura 2) para a obtenção e seleção dos clones positivos, ou seja, que possuem o inserto M.

**Indução com Metanol** As colônias positivas (2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10) e um controle negativo (colônia de *Pichia* mais vetor/sem inserto) transformados, crescidos em meio YPDS ágar contendo antibiótico zeocina (100 mg/mL) foram repicados na placa MMH ágar para a indução com Metanol em placa. Foi adicionado Metanol absoluto na tampa interna da placa a cada 24 horas a uma concentração final de 1%, o mesmo foi feito nos tempos 24, 48 e 72 horas.

**Análise dos Transformantes de *Pichia* por ELISA de colônia** Após a indução com Metanol, sobre a placa de MMH ágar foram colocados uma membrana de nitrocelulose (Hybond C-Extra, Amersham Biosciences) diretamente em contato com as colônias, 3 folhas de papel filtro (Watmann 3MM) e várias camadas de papel toalha. A transferência foi realizada por uma hora. A membrana foi retirada e lavada sob agitação por 3 vezes em solução PBS-T. Posteriormente a membrana foi seca e incubada com a solução de bloqueio (PBS + leite em pó (5%)) por no mínimo 1 hora, sob agitação. Após a membrana foi lavada com PBS-T, para se adicionar o anticorpo primário anti-His-Tag diluído (1 µg/mL) em 10 mL de solução PBS-T. Incubar sob agitação por 4 horas, após lavar com a solução PBS-T, 3 vezes sob agitação, e adicionar o anticorpo secundário anti-Mouse (IgG) (Sigma) conjugado com fosfatase alcalina, diluído (0,1 µg/mL) em 10 mL de solução PBS-T. A incubação foi feita

sob agitação por 1 hora. A membrana foi então lavada com água destilada, posteriormente solução APB e com PBS-T (por 3 vezes), a visualização da reação foi feita com adição de 10 mL de APB e solução reveladora, 33 µL de BCIP (50 ng/mL em 100% dimetilformamida) e 66 µL de NBT (50 ng/mL em 70% dimetilformamida). Após a reação, a membrana foi lavada 3 vezes com água destilada e seca sobre papel filtro.

**Avaliação de proteínas expressadas** A antigenicidade foi testada por ELISA de colônia de acordo com Sambrook & Rousell (1989). Após a revelação da membrana, resultados positivos (Figura 3) foram visualizados (confirmando a presença do antígeno contra o DENV).

## **RESULTADOS**

**Sequenciamento do genoma completo DF-01 (DENV-1)** O isolado **01021093 (DF-01)** do DENV-1 autóctone circulante no Distrito Federal foi selecionado para ser a base deste estudo.

Pela técnica de RT-PCR, o cDNA foi amplificado por PCR com os pares de primers específicos para a amplificação das regiões 6,8 kb e 5,0 kb do genoma do DENV-1. Com o resultado positivo (Figura 1) visualizado em gel de agarose, pares de “primers walking” (Tabela 1) foram desenhados para amplificar o genoma completo do DENV-1.

O isolado DF-01 apresentou 99% de homologia com os isolados do RJ (Den1BR/90) e BR/97-409 pelo programa ClustalW (Tabela 3) e apresentou 6 mutações com o isolado Den1BR/90 (Tabela 2). Uma análise filogenética foi realizada utilizando o método Neighbor Joining através do programa Mega 3.0, em que os sete isolados foram agrupados de acordo com a identidade. Árvore resultante dessa análise demonstrou mais proximidade do isolado DF-01 com Den1BR/90 (Figura 4).

**Clonagem e subclonagem do ME** Pela técnica de RT-PCR, o cDNA foi amplificado por PCR com os pares de primers específicos para a amplificação das regiões ME do genoma do DENV-1. Posteriormente foram clonados no vetor pPUC 19, e digeridos com *Eco* RI e *Sal* I.

**Tabela 2:** Análise das substituições encontradas (aminoácidos) entre o isolado DF-01 e Den1BR/90

| Posição | Região | Den1BR/90 | DF-01 |
|---------|--------|-----------|-------|
| 1428    | E      | T         | A     |
| 1490    | E      | R         | G     |
| 1616    | E      | N         | S     |
| 1940    | E      | S         | N     |
| 1998    | E      | E         | G     |
| 3277    | NS1    | I         | V     |

**Tabela 3:** Resultado do programa ClustalW, estimando a homologia do DF-01 com os demais isolados DENV-1 do Brasil.

|       | BR/97-233 | BR/97-409 | BR/97-111 | BR-01MR | Den1BR/90 | FGA/89 | FGA/na |
|-------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|--------|--------|
| DF-01 | 98        | 99        | 98        | 98      | <b>99</b> | 98     | 97     |

Uma subclonagem foi feita com vetor pPICZ $\alpha$  A um clone pPIC-ME foi selecionado, multiplicado e linearizado com a enzima *Pme* I. Dez  $\mu$ g de pPIC-ME foram transformadas em *P. pastoris*, dez colônias foram obtidas na transformação e sua inserção do gene foi confirmada com PCR de colônia. Após foi realizada a técnica ELISA de colônia. Os clones positivos (2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10) foram selecionados e transferidos para uma placa contendo meio MMH, incubados a 28° C por 3 dias. Após o crescimento das colônias, foi realizada a expressão de proteínas recombinantes através da indução com metanol em placa. Decorridas as 72 horas da indução, as colônias foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Hybond C-Extra, Amersham Biosciences).

Todas as sete colônias mostraram sinais positivos fracos (Figura 3). O teste incluiu um controle negativo, que não mostrou nenhum sinal de cor. Assim sendo, foi concluído que houve expressão específica do gene inserido em levedura.

## **DISCUSSÃO**

Até o presente momento, nenhuma seqüência de isolados do Distrito Federal-DF está disponível em literatura. Com essa motivação foram feitos o sequenciamento do genoma completo do DENV-1 do DF (isolado de 2001, nº 01021093 (DF-01)).

Uma análise foi feita utilizando como base as seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foram observadas seqüências completas dos genomas do DENV-1 de 7 isolados brasileiros (BR/97-233; BR/97-409; BR/97-111; BR/01-MR; Den1BR/90; FGA/89; FGA/na). Concluiu-se que o isolado DF-01 deste trabalho possui maior identidade (99%) com o isolado do RJ (Den1BR/90) (Tabela 3) pelo programa ClustalW.

Analisando as seqüências alinhadas observou-se que o DF-01 possuía 6 mutações no total comparando com Den1BR/90 (Tabela 2). A velocidade de mutação do Dengue e suas divergências genéticas com outras seqüências do DENV servem de estímulo para futuras pesquisas, buscando o conhecimento e monitoramento dos DENV circulantes no DF.

O sistema de expressão neste trabalho foi diferenciado dos demais publicados, sendo a indução feita por sistema ELISA de colônia, resultando em colônias que apresentaram proteínas recombinantes ME do DENV-1 pela reação de cor púrpura de tetrazolium. Apesar de que, este método não estimar a quantidade de proteína expressada de cada clone, a proteína ME apresentou pouca quantidade, há algumas possibilidades prováveis para esse fato: Uma baixa indução devido ao ambiente não favorável (Placa), uma baixa capacidade dos clones para a expressão ou uma degradação pós-incubação, ocorrendo um acúmulo de proteína, principalmente do organismo da *P. pastoris*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLOK, J. *et al.* NS1 gene sequences from eight dengue-2 viruses and their evolutionary relationships with other dengue-2 viruses. **Archive of Virology**, v. 118, p. 209-223, 1991.

FLAMAND, M. *et al.* Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **Journal of Virology**, p. 6104-6110, 1999.

GUBLER, D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n. 3, p. 480-496, 1998.

HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science**, v. 288, p. 476-481, 1988.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **Journal of General Virology**, v. 40, p.531-544, 1978.

KINNEY, R.M. *et al.* Construction of infectious cDNA clones for Dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuation vaccine derivate, strain PDK-53. **Virology**, v. 230, p. 300-308, 1997.

MANGADA, M.N.; IGARASHI, A. Sequence of terminal non-coding regions from four dengue-2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severitics. **Virus Genes**, v. 14, p. 5-12, 1997.

MANGADA, M.N.; IGARASHI, A. Molecular and *in vitro* analysis of eight dengue-2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. **Virology**, v. 244, p. 458-466, 1998.

MEN, R. *et al.* Dengue type 4 virus mutants containing deletion in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremic pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. **Journal of Virology**, v. 70, p. 3930-3937, 1996.

MIAGOSTOVICH, M.P. *et al.* Molecular epidemiology of den-2 in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 625-626, 1998.

REGENMORTEL, M.H.V. *et al.* **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. 17. ed. New York: Academic Press. 2000, 859-864 p.

SAMBROOK, J.; ROUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SANTOS, C.N.D. *et al.* Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virology**, v. 274, p. 292-308, 2000.

SANTOS, C.N.D. *et al.* Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. **Virus Research**, v. 90, p. 197-205, 2002.

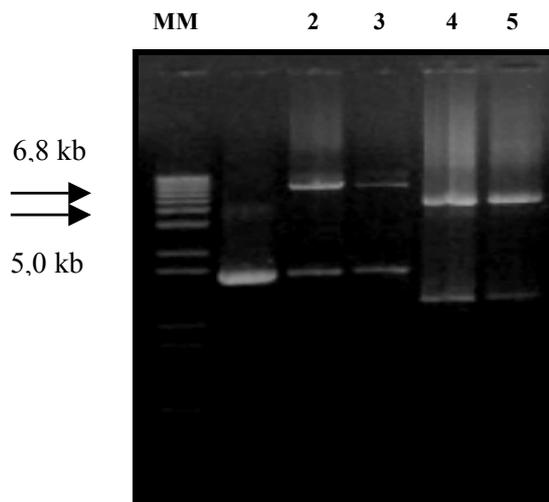
SHU, P.Y. *et al.* Comparison of Capture Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific IgG ELISA for Differentiation of Primary and Secondary *Dengue Virus* Infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 622-630, 2003.

SUGRUE, R.J. *et al.* The production of recombinant *dengue virus* E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Journal Virology Methods**, v. 69, p. 159-169, 1997 a.

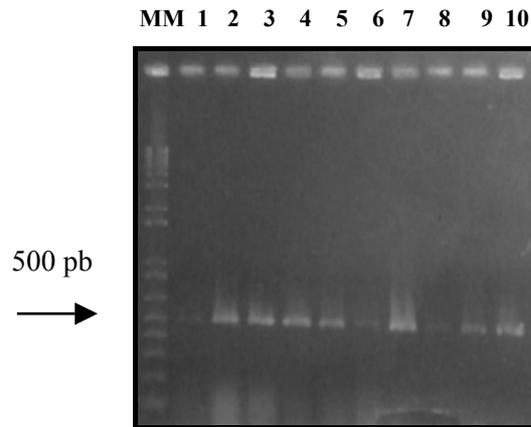
SUGRUE, R.J. *et al.* Expression of the *dengue virus* structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. **Journal of General Virology**, v. 78, p.1861-1866, 1997 b.

UNDP World Bank – WHO: special programme for research and training in tropical diseases. 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/dengue/direction.htm>>. Acesso em: 02 ago. 2005.

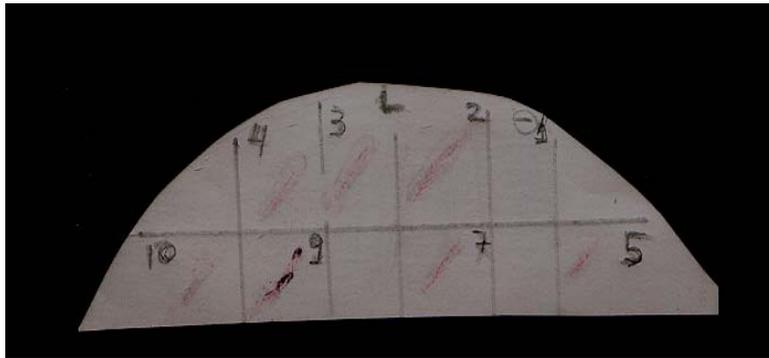
WEI, H.Y. *et al.* Secreted expression of *dengue virus* type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 109, p. 17-23, 2003.



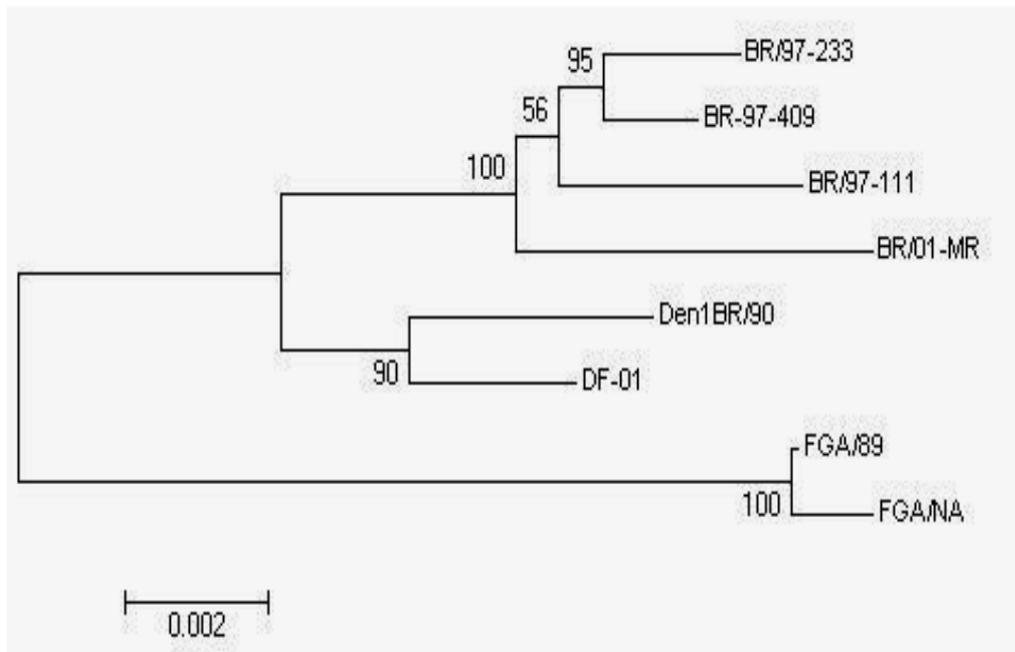
**Figura 1:** Fotografia do gel de agarose evidenciando os produtos amplificados (regiões 6,8 e 5,0 kb). Poço MM (Marcador Molecular 1kb Plus Ladder); Poços 2 e 3 (Isolado DF-01 (PCR – DENV-1) tamanho 6,8 kb e Poços 4 e 5 (Isolado DF-01 (PCR – DENV-1) tamanho 5,0 kb).



**Figura 2:** Fotografia do gel de agarose evidenciando os produtos amplificados por PCR colônia correspondentes à região pPIC-M (500 pb). Poço MM (Marcador Molecular 1kb Plus Ladder); Poços 1 a 10 tamanho 500 pb.



**Figura 3:** Membrana apresentando resultado positivo (colônias 2, 4, 5, 7, 9 e 10) e negativo (colônia 1) do método Elisa de colônia, clones DF-01 (DENV-1) pPICZ $\alpha$  A-ME.



**Figura 4:** Árvore filogenética com resultados de alinhamentos de DENV-1 brasileiros.