



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA GENERALISTA**

BEATRIZ DANTAS GUIMARÃES

**AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO VÍRUS DA
DENGUE ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
(PCR)**

**CAMPINA GRANDE
2016**

BEATRIZ DANTAS GUIMARÃES

**AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO VÍRUS DA
DENGUE ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
(PCR)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharelado em Farmácia Generalista.
Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Mathias Weller

**CAMPINA GRANDE
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

G963a Guimarães, Beatriz Dantas.

Amplificação do gene da proteína do envelope do vírus da dengue através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) [manuscrito] / Beatriz Dantas Guimarães. - 2016.
43 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Mathias Weller, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR. 2. Dengue. 3. DENV. 4. Gene E. I. Título.

21. ed. CDD 572.8

BEATRIZ DANTAS GUIMARÃES

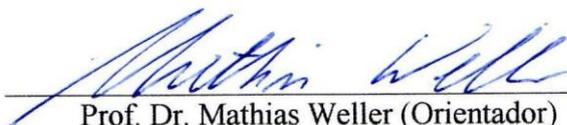
AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO VÍRUS DA DENGUE
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharelado em Farmácia Generalista.

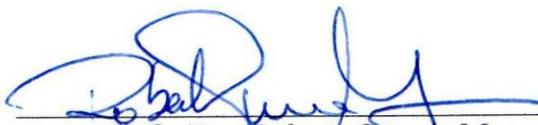
Área de concentração: Genética.

Aprovada em: 28/09/2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mathias Weller (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Roberta Simana Marques
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primordialmente à minha família, meu porto seguro, meu sustento, minha luz, meu mundo, pelo apoio em cada segundo desse percurso, pela ajuda nas dificuldades, por estar por mim numa das mais importantes etapas da minha vida. Eu nunca chegaria até aqui sem seu apoio. Obrigada por simplesmente existir.

Ao professor Dr. Mathias Weller, por ser um professor, orientador e cientista excepcional; pela dedicação, assistência, atenção, ensinamentos, paciência e bom humor durante este trabalho. Foi um enorme prazer trabalhar sob sua orientação por quase todo o curso. Agradeço eternamente por ter me ensinado o que é fazer ciência, em sua forma mais pura.

Aos professores da banca avaliadora (Leonardo Ferreira Soares e Roberta Smania), por toda contribuição e por aceitarem fazer parte deste momento tão importante.

Aos colegas de trabalho e de curso (Herbert, Hortência, Ana Michelle, Thamires, Thayse e Bruno) pelo apoio, incentivo e ajuda.

À todos que fizeram parte da minha história e me acompanharam até aqui.

“Há na loucura um prazer que só os loucos conhecem”

(John Dryden)

RESUMO

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem como sua maior aplicação a possibilidade de amplificar um segmento de DNA, produzindo milhões de cópias do segmento selecionado. A clonagem gênica tem objetivo de introduzir um gene selecionado dentro de bactérias idênticas entre si, e essa técnica requer a presença de um vetor de clonagem capaz de amplificar um fragmento de DNA neles clonados. O *gene E* do vírus da dengue (DENV) é o mais utilizado para estudos moleculares devido à importância da proteína E. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer técnicas de amplificação do *gene E* do DENV-2 e DENV-4. A molécula de DNA foi obtida da FIOCRUZ em Recife; os *primers* foram selecionados de modo a englobar o *gene E*. A separação dos fragmentos foi feita por eletroforese em gel de agarose. A amplificação por PCR foi satisfatoriamente estabelecida para o *gene E*. Uma vez determinadas, estas técnicas são imprescindíveis nas etapas de obtenção de DNA recombinante no processo de clonagem e expressão da proteína E da dengue.

Palavras-Chave: Reação em Cadeia da Polimerase - PCR. Dengue. DENV. *Gene E*.

ABSTRACT

The polymerase chain reaction has as greater application the possibility of amplify a DNA fragment, generating millions copies of the selected segment. Gene cloning aims to introduce a selected gene into bacterias identical to each other, and this technique requires the presence of a host cloning vector capable of amplifying a DNA fragment cloned therein. The *E gene* of dengue virus (DENV) is the most commonly used for molecular studies due to the E protein importance. The present study had as purpose to establish *E gene* amplification techniques for both DENV-2 and DENV-4. The DNA molecule was obtained from FIOCRUZ organization located in Recife; the *primers* were selected to encompass the *E gene*. The fragments separation was performed by agarose gel electrophoresis. The PCR amplification was satisfactorily established to the *E gene*. Once set, these techniques are indispensable steps for obtaining a recombinant DNA in E protein cloning and expression process.

Keywords: Polymerase Chain Reaction - PCR. Dengue. DENV. *E gene*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Primeiro ciclo da amplificação pela técnica de PCR	18
Figura 2 –	Resultado da amplificação de DNA após vários ciclos	18
Figura 3 –	Ligação do vetor de clonagem com inserto	19
Figura 4 –	Estrutura molecular de um plasmídeo usado em clonagem molecular	20
Figura 5 –	Estrutura da partícula viral (DENV)	21
Figura 6 –	Organização genômica do DENV	22
Figura 7 –	Representação dos três domínios da proteína E	22
Figura 8 –	Internalização do vírus mediada pela proteína E	23
Figura 9 –	Plasmídeo vetor de clonagem pGEX-2T	24
Figura 10 –	<i>Primers</i> externos e <i>primers</i> internos ao gene E	27
Figura 11 –	Resultado da amplificação de DNA por PCR	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	<i>Primers</i> do vetor pGEX-2T e temperaturas de desnaturação	25
Tabela 2 -	<i>Primers</i> do DENV-2 e DENV-4 e suas temperaturas de desnaturação	26
Tabela 3 -	Combinações de <i>primers</i> e arranjos de reação da PCR do gene E.....	28
Tabela 4 -	Programação dos ciclos de temperatura em termociclador da PCR	29
Tabela 5 -	Mistura de componentes da PCR correspondente a cada poço	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DE2-F _x R _x	Vírus da dengue sorotipo 2; <i>forward primer</i> ; <i>reverse primer</i>
DE4-F _x R _x	Vírus da dengue sorotipo 4; <i>forward primer</i> ; <i>reverse primer</i>
DENV	Vírus da dengue
DENV-1	Vírus da dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus da dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus da dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus da dengue sorotipo 4
DENV-5	Vírus da dengue sorotipo 5
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GST	Glutathione-S-Transferase
H ₂ O	Água
H ₂ O _{bidest}	Água bidestilada
Nested-PCR	Reação em cadeia da polimerase aninhada
NS1	Proteína 1 não estrutural
NS2A	Proteína 2A não estrutural
NS2B	Proteína 2B não estrutural
NS3	Proteína 3 não estrutural
NS4A	Proteína 4A não estrutural
NS4B	Proteína 4B não estrutural
NS5	Proteína 5 não estrutural
N-terminal	Amino-terminal
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MSC	Múltiplos Sítios de Clonagem
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
Proteína C	Proteína da capsídeo
Proteína E	Proteína do envelope
Proteína M	Proteína da membrana

RNA	Ácido ribonucleico
Tampão TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Tris-base	Base de trisaminometano
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
kb	Quilobytes
L	Litro
M	Molaridade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto
pb	Pares de bases de nucleotídeos
seg	Segundo
UV	Luz ultravioleta
V	Volt
μl	Microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Reação em cadeia da polimerase	16
2.2	Clonagem molecular	19
2.2.1	<i>Vetores de clonagem</i>	19
2.3	Organização estrutural e genômica do DENV	21
2.3.1	<i>Proteína E</i>	22
3.	METODOLOGIA	24
3.1	Amplificação do vetor pGEX-2T	24
3.2	Amplificação do gene E: DENV-2 e DENV-4	26
3.2.1	<i>Primers – DENV-2 e DENV-4</i>	26
3.2.2	<i>A mistura de reação e os tipos de PCR realizados</i>	27
3.3	Termociclador	29
3.3.1	<i>Temperatura de anelamento</i>	29
3.3.2	<i>Programação do termociclador</i>	29
3.4	Eletroforese	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
	APÊNDICE A	40
	APÊNDICE B	42
	APÊNDICE C.....	43

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de reação em cadeia da polimerase foi concebida na década de 1980, tendo como sua maior aplicação a possibilidade de amplificar determinado segmento de DNA através de síntese enzimática *in vitro*, produzindo milhões de cópias do segmento específico selecionado (CARUSO, 2007; ZAHA et al., 1996). A PCR envolve três etapas, que constituem um ciclo básico de replicação por PCR: desnaturação do DNA-molde, hibridização com “primers” que delimitarão a região de interesse a ser duplicada, extensão do segmento selecionado utilizando a enzima DNA-polimerase.

Além do processo de amplificação de sequências específicas num DNA, várias outras aplicações podem ser atribuídas e auxiliadas por essa técnica: a amplificação de um gene utilizando a PCR é uma etapa primordial para obter a quantidade de DNA necessária para ser aplicada na etapa de clonagem molecular, e a PCR em tempo real é hoje aplicada para quantificar a expressão de genes (CARUSO, 2007).

A clonagem gênica tem objetivo de introduzir um gene selecionado dentro de bactérias idênticas entre si (NASCIMENTO et al., 1999) e consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas, sendo a técnica central para estabelecer o método da tecnologia do DNA recombinante (CARUSO, 2007). A técnica requer a presença de um vetor de clonagem capaz de amplificar um fragmento de DNA neles clonados - como os genes obtidos por PCR - sendo o plasmídeo um dos vetores de clonagem mais relevantes. O gene amplificado deve ser ligado ao vetor e a molécula híbrida deve ser introduzida numa célula hospedeira, geralmente células bacterianas (LIMA, 2008). A manipulação de genes específicos utilizando transformação bacteriana contendo as moléculas de DNA transgene permite, ao fim das etapas, a expressão e obtenção de proteínas híbridas.

A dengue é uma doença infecciosa aguda que constitui um dos grandes problemas de saúde pública no mundo (GUBLER, 1998) e seu agente etiológico, o vírus da dengue (DENV), é classificado como arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. São vírus de RNA de fita simples, compreendendo quatro sorotipos virais de importância epidemiológica (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), geneticamente relacionados, compartilhando aproximadamente 65% da sequência de nucleotídeos de seus genomas (MONDINI et al., 2009; WHITEHEAD et al., 2007; MURREL et al., 2011). O genoma do DENV codifica uma única poliproteína, posteriormente clivada em sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) e três proteínas estruturais que

constituem o vírus (proteína C do capsídeo, proteína M da membrana e proteína E do envelope) (CHAMBERS et al., 1990).

Embora tenham grande proximidade genética, os sorotipos DENV são antigenicamente distintos, principalmente devido à diferenças encontradas nas sequências de aminoácidos presentes na proteína E dos quatro sorotipos virais (SHRESTHA et al., 2010).

Os quatro sorotipos da dengue podem causar, desde enfermidade febril indiferenciada até formas mais graves, como a febre hemorrágica da dengue, todas elas conferindo ao indivíduo imunidade permanente ao sorotipo responsável pela infecção. Contudo, a infecção não confere imunidade cruzada contra os outros sorotipos (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 1995),

Estando as formas mais graves associadas principalmente à resposta imunológica em casos de reinfecção por um sorotipo diferente (MONGKOLSAPAYA et al., 2003), a distinção do sorotipo infectante faz-se importante, mas a distinção por PCR ou isolamento viral combinado à métodos imunológicos de identificação de cepas utilizando anticorpos a proteína não-estrutural NS1 é demorado, difícil e possui baixa sensibilidade (ARAÚJO, 2015; BRASIL, 2013; CARDOSA, 1998).

O gene E, alvo principal deste trabalho, é o mais utilizado para estudos moleculares do DENV, devido à importância da glicoproteína E codificada por este gene (CHAMBERS et al., 1990; LEITMEYER et al., 1999). A proteína E é a maior proteína da superfície da partícula viral, formada por três domínios distintos, com importantes funções na atividade biológica viral, como interação à receptores celulares do hospedeiro e entrada do vírus na célula. Estudos sugerem que a proteína E é a mais indicada para escolha no diagnóstico do sorotipo viral (BARROS, 2007) por estar exposta na superfície do vírion, ser responsável pela interação com receptores celulares e representar o principal alvo dos anticorpos neutralizantes (JAISWAL et al., 2003), enfatizando a importância da presente pesquisa.

Este trabalho faz parte de um projeto que tem como objetivo final a expressão da proteína E dos 4 sorotipos virais distintos, utilizando a molécula recombinante do gene E inserida no vetor de clonagem pGEX-2T, por meio da clonagem gênica, visando desenvolvimento de um teste imunodiagnóstico ELISA para distinção dos sorotipos com anticorpos monoclonais produzidos a partir da proteína E, em cooperação com o departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

O presente trabalho foi realizado nas dependências da Central de Laboratórios Três Marias, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, com objetivo de estabelecer técnicas para amplificação do gene E do

DENV-2 e DENV-4: sendo estas etapas essenciais à clonagem e expressão da proteína E destes sorotipos. As etapas subsequentes para a técnica de clonagem molecular se encontra em andamento no mesmo local.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um procedimento que possibilita a amplificação de fragmentos específicos de DNA, partindo-se de um DNA alvo, sendo uma técnica bastante utilizada para clonar diretamente DNA com genes de interesse. A PCR é uma técnica muito sensível, permitindo a detecção e amplificação de uma única molécula de DNA em uma amostra (ALBERTS et al., 2009).

Para aplicação da técnica, é necessário, inicialmente, a dupla fita do DNA - que servirá de molde para amplificação - e um par de oligonucleotídeos (*primers*) específicos, que iniciarão a síntese do DNA. Os primers são segmentos de fita simples e complementares às fitas moldes em posições que definem as extremidades do segmento a ser amplificado. A PCR necessita, ainda de outros três componentes: DNA polimerase, dNTPs, tampão e sais (MgCl) (LIMA, 2008; NELSON et al., 2014; ALBERTS et al., 2009).

Na presença de uma DNA-polimerase termoestável, de precursores de DNA (os quatro desoxirribonucleosídeos fosfatados - dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), condições ideais de pH (utilizando tampão), salinidade e o cofator enzimático (íons magnésio bivalentes – Mg^{+2}), a síntese das novas fitas inicia. O volume da reação varia com o objetivo, sendo realizada em volumes de 10 a 50 μ l (LUDWIG, 2010; UHLMANN et al., 1998).

O método da PCR consiste em ciclos repetitivos de 3 etapas:

Etapa 1 – DESNATURAÇÃO DO DNA: As duas cadeias de DNA são mantidas unidas na dupla-hélice por ligações de hidrogênio relativamente fracas, que se quebram a altas temperaturas. A mistura dos componentes é aquecida para desnaturar o DNA (geralmente a 94°C, por 1-2min), separando a dupla fita e formando duas fitas simples que serão utilizadas como moldes para os *primers* e para DNA polimerase. As ligações fosfodiéster entre o fosfato e a desoxirribose são ligações covalentes mais fortes e permanecem intactas (LUDWIG, 2010; UHLMANN et al., 1998; LIMA, 2008).

Etapa 2 – ANELAMENTO DOS PRIMERS: Em seguida, a temperatura é resfriada para permitir a hibridização dos *primers* (anelamento) às sequências complementares no DNA, para que estes possam renaturar com o DNA. A temperatura de anelamento varia entre 50 a 60 °C, e depende da temperatura média de desnaturação dos primers (*melting temperature* – T_m). *Primers* exclusivos de cada extremidade da sequência alvo são necessários

para amplificar somente a sequência de interesse, por isso, é a variável mais importante para determinar a especificidade da PCR, de forma que as temperaturas e os tempos de anelamento variam de acordo com a sequência a ser amplificada (LUDWIG, 2010; Kim et al., 2002).

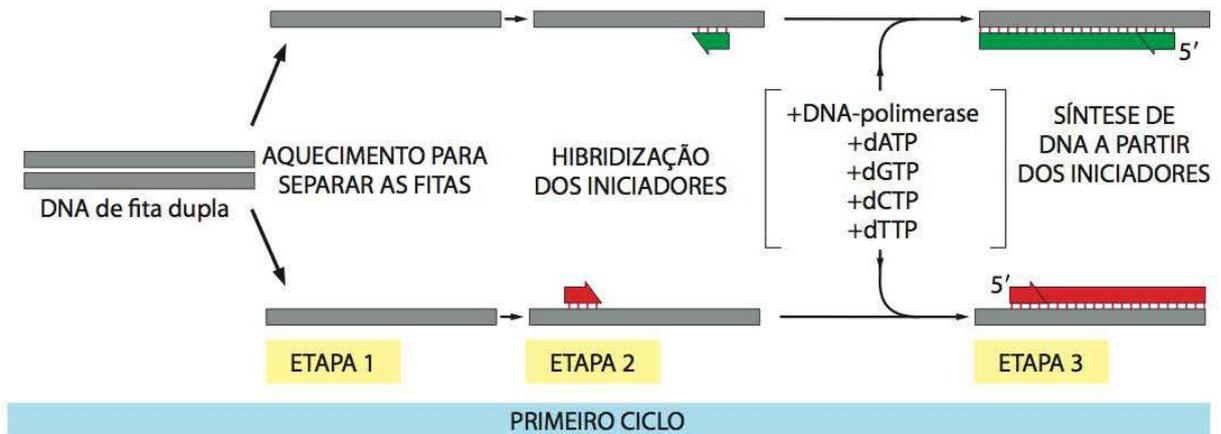
Etapa 3 – POLIMERIZAÇÃO: Nesta etapa, a mistura é novamente aquecida para temperatura ótima de replicação (aproximadamente 72°C), de forma que o fragmento de DNA seja replicado seletivamente na região de anelamento de cada *primer*, pela adição de dNTPs por uma enzima DNA polimerase. A depender do tamanho do segmento a ser amplificado, o tempo de extensão irá variar de 30s a 5min (LUDWIG, 2010; Kim et al., 2002; LIMA, 2008).

O ciclo de aquecimento, resfriamento e replicação é repetido de 20 a 30 ciclos em termocicladores, que automaticamente controlam e alternam as temperaturas durante os períodos programados de tempo, para o número apropriado de ciclos. Cada ciclo duplica a quantidade de DNA sintetizado no ciclo anterior, e os fragmentos novos gerados servem como molde para o próximo ciclo. Desta forma, vários ciclos resultam no acúmulo exponencial do fragmento de DNA flanqueado pelos dois primers (LUDWIG, 2010; NELSON et al., 2014).

Como cada ciclo requer um tratamento de calor que separe as fitas da dupla-hélice do DNA-molde, a PCR utiliza uma DNA-polimerase termoestável, isolada de uma bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polimerase), de forma que ela não é desnaturada pelo aquecimento de cada ciclo (LUDWIG, 2010; NELSON et al., 2014; ALBERTS et al., 2009).

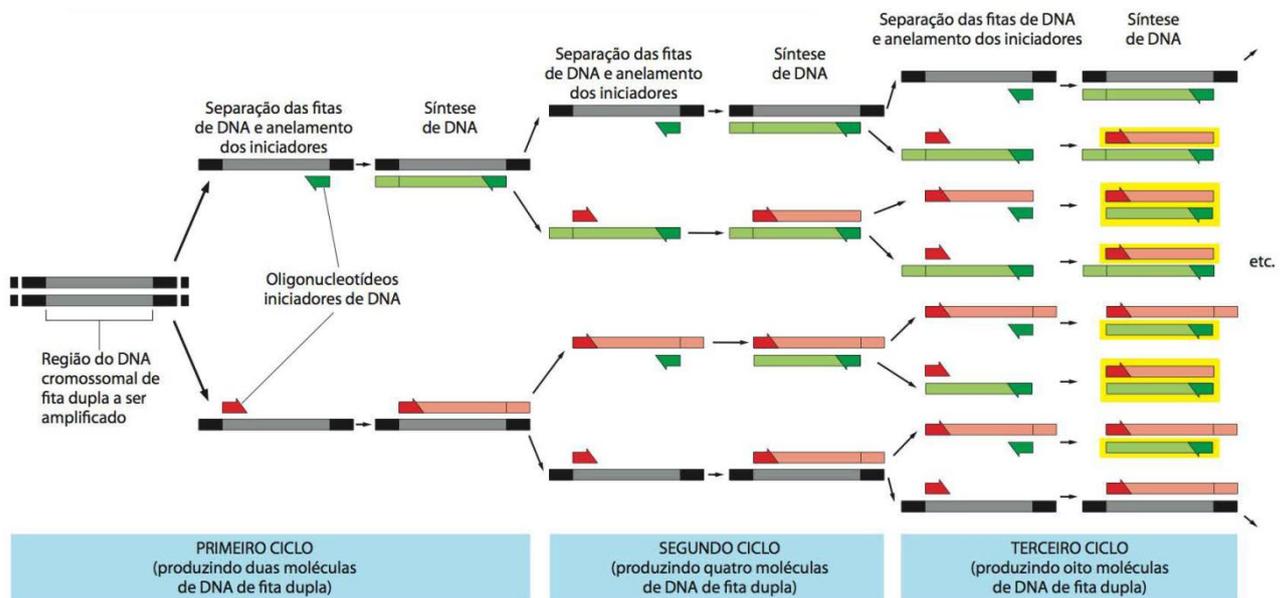
O resultado da PCR (amplicon) é geralmente analisado por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, e o tipo de matriz utilizada vai depender do tamanho dos segmentos de DNA que se pretende separar e visualizar. Devido à diferença no tamanho dos poros das matrizes, géis de agarose são geralmente utilizados para separar fragmentos que variam de 0,2 kb a 50 kb (1 kb = 1000pb - pares de base) e géis de poliacrilamida para fragmentos de até 1kb.

Figura 1 – Etapas do primeiro ciclo da amplificação de DNA pela técnica de PCR.



Fonte: ALBERTS, 2009.

Figura 2 - Resultado da amplificação de DNA após vários ciclos, demonstrando que ao fim de vários ciclos, é possível obter cópias idênticas do fragmento selecionado em quantidades exorbitantes



Fonte: ALBERTS, 2009.

Neste trabalho, foram estabelecidos os protocolos para amplificação do gene E de DENV-2 e DENV-4, utilizando *primers* específicos que incluíam este gene codificante da proteína E.

2.2 Clonagem molecular

A clonagem molecular é a técnica central da tecnologia do DNA recombinante, a qual consiste em isolar e propagar moléculas de DNA com gene recombinante de interesse em células bacterianas geneticamente idênticas a inicial, isolando-as em colônias (LIMA, 2008). Consiste basicamente de duas etapas:

ETAPA 1 - Ligação entre um fragmento de DNA com o gene de interesse (chamado inserto), com outra molécula de DNA, o vetor de clonagem, para formação de uma quimera ou DNA recombinante (BROWN, 2003).

ETAPA 2 - A molécula recombinante é transportada para dentro de uma célula hospedeira compatível, geralmente uma bactéria, ocorrendo o processo chamado de *transformação*. A célula que recebeu o DNA é chamada *transformante* (BROWN, 2003). Um único transformante, em condições ideais, sofre inúmeros ciclos de divisão celular, produzindo colônias com milhares de cópias do DNA recombinante (LIMA, 2008; CARUSO, 2007).

Figura 3- Ligação do vetor de clonagem com inserto (gene amplificado de interesse), produzindo uma molécula de DNA recombinante.



Fonte: LIMA, 2008.

Para realização da etapa 1 da clonagem molecular, são imprescindíveis duas moléculas de DNA: o inserto, contendo o gene de interesse; e uma molécula capaz de amplificar esta informação em centenas de cópias: um vetor de clonagem.

2.2.1 Vetores de clonagem

Os tipos básicos de vetores utilizados na metodologia do DNA recombinante apresentam características especiais que os tornam excelentes veículos de clonagem, sendo os vetores mais utilizados plasmídeos de bactérias.

Plasmídeos são pequenas moléculas de DNA circular existentes em bactérias, de fita dupla, fora dos cromossomos bacterianos, sendo capazes de se replicar de modo independente. Os plasmídeos variam em estrutura, tamanho, modo de replicação e na habilidade de se propagarem em diferentes bactérias. São utilizados como veículos de clonagem desde que capacitem a amplificação de um gene de interesse neles inserido, contêm elementos necessários a sua replicação e pelo menos um gene que confere resistência a antibiótico (NASCIMENTO, 1999; CARUSO, 2007; LIMA, 2008).

Para ser considerado um bom vetor de clonagem, um plasmídeo deve conter três características básicas (NASCIMENTO, 1999; BROWN, 2003; WEAVER, 2001):

1) **ORIGEM DE REPLICAÇÃO** – sequência de DNA que permite replicação do vetor, de forma independente, na célula hospedeira.

2) **SÍTIOS DE CLIVAGEM** – dois ou mais sítios de clivagem para endonucleases de restrição, no qual é inserido o fragmento de DNA, sem interferir na funcionalidade do plasmídeo. O conjunto desses sítios é denominado *Múltiplos Sítios de Clonagem* (MSC).

3) **GENE QUE CODIFICA UM PRODUTO QUE DISTINGUE A CÉLULA TRANSFORMADA DA CÉLULA NÃO-TRANSFORMADA** – como genes que conferem resistência a antibióticos.

Figura 4 - Estrutura molecular de um plasmídeo típico usado em clonagem molecular. Gene que confere resistência ao antibiótico Ampicilina está representado por AmpR, a região de múltiplos sítios de clonagem por MSC e a origem de replicação por O.



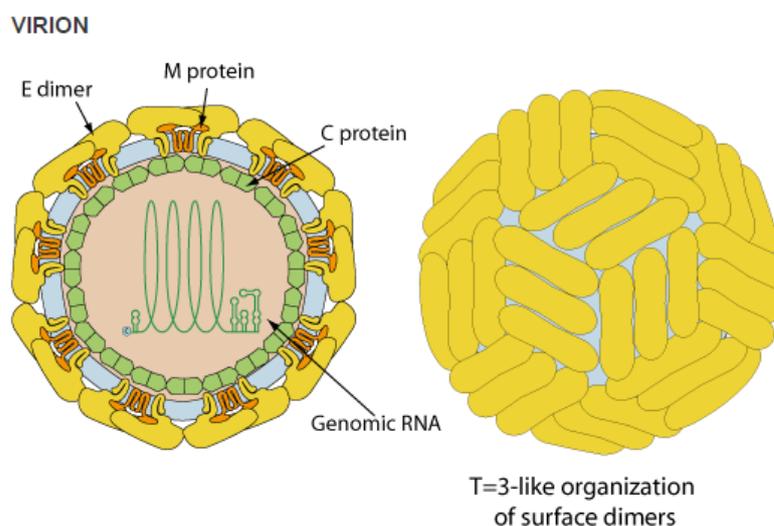
Fonte: CARUSO, 2007.

O gene amplificado de DNA, como o gene da proteína E, foco deste trabalho, pode ser inserido num plasmídeo linearizado e tratado com a enzima fosfatase alcalina - impede a religação vazia do vetor - juntamente com a enzima T4 DNA ligase, que permite a ligação entre eles, gerando uma molécula de DNA transgênica.

2.3 Organização estrutural e genômica do DENV

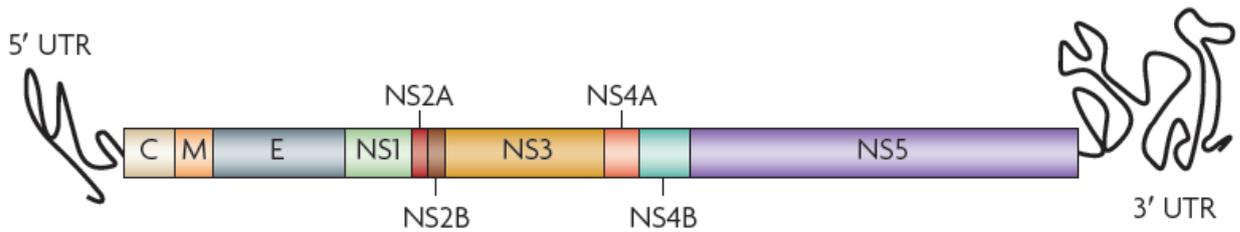
O DENV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos de antígenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (WESTAWAY et al., 1985). Há, ainda, o sorotipo DENV-5, porém apenas os quatro primeiros possuem importância epidemiológica até o presente momento (BARROS et al., 2008; MACIEL et al., 2008; MUSTAFA et al., 2015). Ele é um vírus esférico, com 40 a 50 nm de diâmetro, contendo um core elétron denso de 30 nm envolvido por um envelope bi-lipídico, onde se encontram ancoradas as proteínas E em dímeros (envelope) e a proteína M (membrana) (LINDENBACH et al., 2007; WESTAWAY et al., 1985).

Figura 5 – Estrutura da partícula viral (DENV). O vírus é envolvido por um envelope bilipídico onde estão ancoradas as proteínas E e M. Ainda, a proteína do capsídeo C, com afinidade para o genoma viral de RNA.



Fonte: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/43.html.

O vírus apresenta a proteína C do capsídeo, que é altamente básica e possui afinidade para o genoma viral, que consiste de RNA fita simples com polaridade positiva e tamanho de aproximadamente 11kb (ALCATRAZ-ESTRADA et al., 2010). Este genoma possui cerca de 11.000 nucleotídeos e apenas uma fase aberta de leitura (ORF) (CHAMBERS et al., 1990), no qual codifica uma única poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares nas 3 proteínas estruturais (proteína C, proteína M e proteína E) – localizadas na porção 5' - e em 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) – na porção 3' (BARROS, 2007; YAP et al., 2007).

Figura 6 - Organização genômica do DENV.

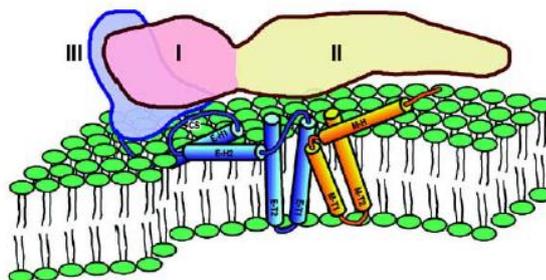
Fonte: GUZMÁN, 2010.

2.3.1 Proteína E

A glicoproteína E, constituinte do envelope, de 50-55 kDa é o principal componente da superfície do vírus, as principais propriedades biológicas do DENV estão relacionadas à esta proteína. É responsável por propriedades fenotípica, antigênica, virulência e tropismo, além de induzir a fusão com a membrana e a ligação à receptores celulares (OLIVEIRA, 2013), sendo essencial nas fases de absorção e penetração do vírus na célula (HENCHAL et al., 1990). De acordo com Bricks (2004) os anticorpos dirigidos à esta proteína determinam a imunidade protetora de mais longa duração.

A proteína E possui três domínios estruturais e funcionais (DI, DII e DIII), aos quais são relacionados à presença de regiões antigênicas e epítomos específicos (CRILL & CHANG, 2004). O domínio I constitui a região central do N-terminal, o domínio II constitui a região de dimerização da proteína e está envolvido na fusão da membrana mediada pelo vírus. O domínio III é a região responsável pela ligação da proteína ao receptor da célula hospedeira, sendo, ainda, o domínio de maior alvo para neutralização de anticorpos (GUZMÁN; KOURÍ, 2004).

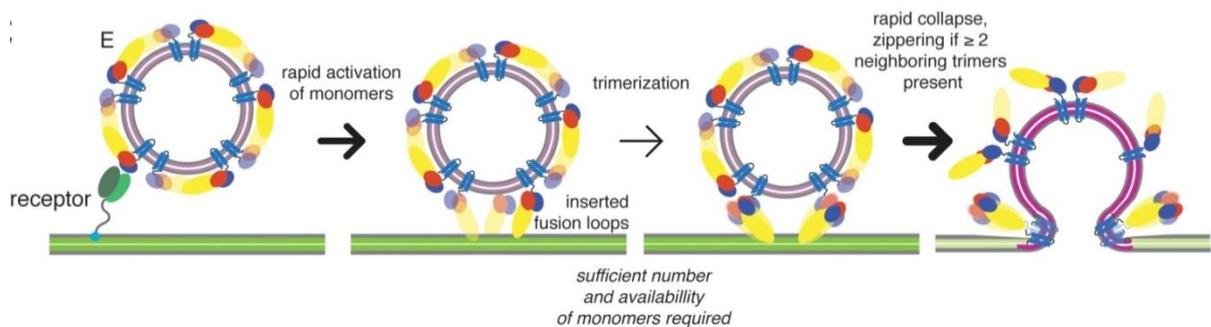
Figura 7 - Representação dos três domínios da proteína E. O domínio I está representado em rosa, o domínio II em amarelo e o domínio III em azul.



Fonte: ZHANG, 2003.

Após a ligação da glicoproteína E aos receptores de superfície, a partícula viral é internalizada em um compartimento endossomal. Sob condições de baixo pH, encontrada nos endossomos, os homodímeros da proteína E se dissociam em monômeros, se re-associando em trímeros irreversíveis em seguida, de forma a expor o peptídeo de fusão do domínio II. O trímero estende-se em direção a membrana do endossomo, e o peptídeo de fusão se insere nesta. A fusão de membranas endossomal e viral possibilita a penetração do nucleocapsídeo viral na célula hospedeira e o desnudamento do genoma viral (MUKHOPADHY et al., 2005).

Figura 8 – Internalização do vírus mediada pela proteína E.



Fonte: CHAO, 2014.

A maioria dos anticorpos neutralizantes do vírus são contra epítomos específicos da proteína E (CARDOSA et al., 1998). Anticorpos monoclonais para a proteína E se mostraram capazes de neutralizar o vírus da dengue *in vitro* (CLYDE et al., 2006) e sua relação com receptores celulares envolvidos na fusão com a membrana e entrada do vírus na célula já foram elucidadas para diferentes sorotipos do vírus da dengue, sendo alvo de estudos para muitas pesquisas (ARAÚJO, 2015; KOSTYUCHENKO et al., 2014).

3. METODOLOGIA

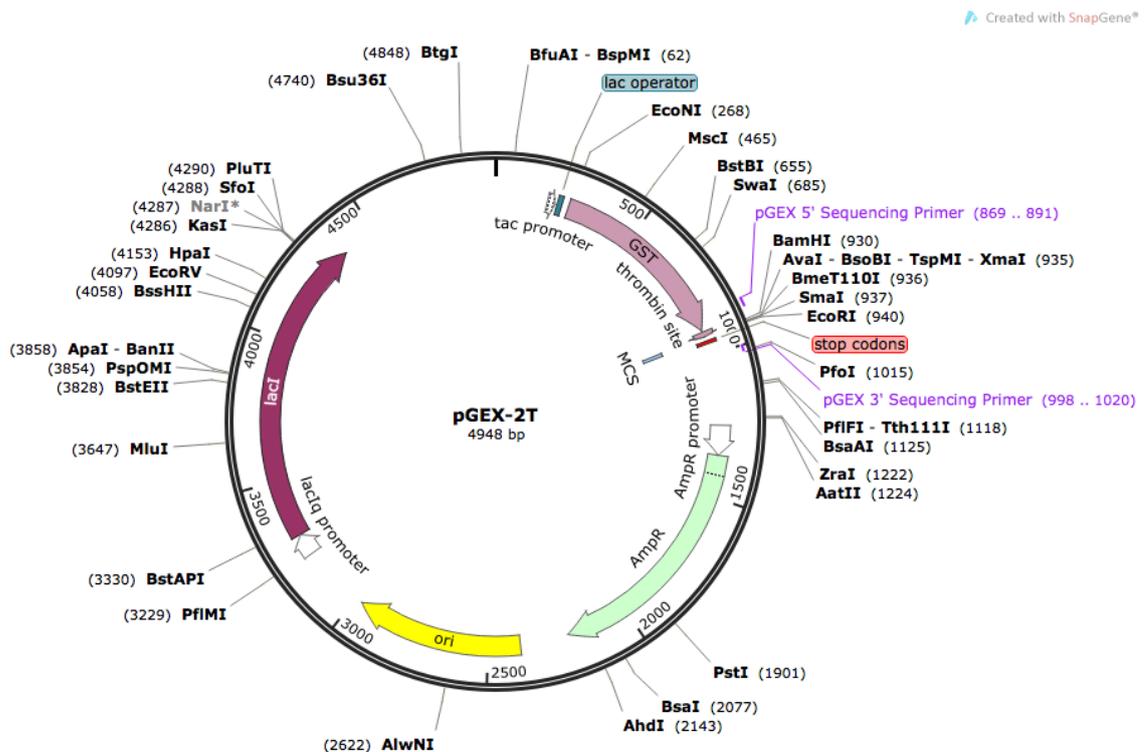
Para o processo de clonagem, é requerido um plasmídeo recombinante com o gene E inserido. Para isso, é necessário realizar a amplificação por PCR do gene E de DENV-2 e DENV-4, para que se possa prosseguir com as etapas subsequentes da clonagem.

Os métodos para estabelecer a técnica de amplificação do gene E se encontram descritos a seguir.

3.1 Amplificação do vetor pGEX-2T

O vetor de clonagem utilizado, pGEX-2T, consiste em uma molécula de DNA circular, conforme a figura 9 abaixo:

Figura 9 - Plasmídeo vetor de clonagem pGEX-2T. Pode-se observar que este plasmídeo contém todas as características essenciais de um vetor: origem de replicação, sítio de clonagem (Sma I e Eco RI), inúmeros sítios de restrição (representados pelas siglas em negrito) e um gene que confere a resistência à ampicilina.



O vetor pGEX-2T é um vetor de expressão proteica. Os sítios de restrição Eco RI e Sma I permitem a linearização do DNA circular do plasmídeo, para que se possa realizar a inserção do gene de interesse no vetor, com formação do transgene. Pela inserção do DNA nestes sítios, é possível gerar um texto de leitura de uma proteína quimérica, codificado pelo gene Glutathione-S-Transferase (GST) e o DNA do gene inserido. O GST serve para purificação da proteína expressa.

O vetor pGEX-2T havia sido anteriormente tratado com a enzima de restrição Sma I (937 pb), para posterior utilização na clonagem. Um procedimento complementar à digestão foi feito para impedir a religação vazia do vetor: a remoção do fósforo das extremidades 5' livres do vetor linearizado, pela ação da enzima fosfatase alcalina. Desta forma, o pGEX-2T, devidamente linearizado e tratado, mantém-se apto à inserção do transgene após amplificação adequada.

No presente trabalho, os *primers* selecionados visaram a amplificação de apenas um fragmento do vetor pGEX-2T circular, de tamanho 1146 pb, objetivando estabelecer um PCR de controle. Os *primers* utilizados para amplificação, assim como suas respectivas temperaturas de desnaturação encontram-se na tabela a seguir:

Tabela 1 – *Primers* utilizados para amplificação do fragmento de tamanho 1146 pb do vetor pGEX-2T e suas respectivas temperaturas de desnaturação.

Forward <i>primer</i>	Reverse <i>primer</i>	Temperatura de desnaturação (<i>melting temperature</i>)
pGEX-F2	pGEX-R2	pGEX-F2 (61,4°C) pGEX-R2(61,4°C)

Sequências nucleotídicas dos *primers*:

pGEX-F2: TCAGGTGGCACTTTTCGGGG

pGEX-R2: GAGCGTCAGACCCCGTAGAA

As sequências nucleotídicas do pGEX-2T, assim como a localização dos *primers* selecionados e o fragmento do genoma amplificado com estes *primers* encontra-se em **APÊNDICE A**.

Os componentes para mistura da reação e suas respectivas quantidades, totalizando em 50 µl, estão listados abaixo:

- 39,5 µl H₂O;
- 5 µl Tampão;
- 1,5 µl MgCl₂ (concentração – 50mM);
- 1 µl dNTPs (concentração – 10mM);
- 0,5 µl pGEX-2T (template);
- 1 µl Forward primer (concentração – 20mM);
- 1 µl Reverse primer (concentração – 20mM);
- 0,5 µl Taq polimerase.

3.2 Amplificação do gene E: DENV-2 e DENV-4

Para amplificação do gene E da proteína E do envelope viral, foi utilizada a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). A molécula de DNA utilizada neste trabalho foi obtida da FIOCRUZ em Recife, contendo o gene da proteína E do DENV-2 e DENV-4, com cerca de 1500 pares de base – de acordo com dados disponíveis na plataforma do NCBI (referências: Dengue virus type 2 isolate CEA2440 polyprotein gene, partial cds GenBank: AY775303.1; Dengue virus 4 strain SPH317947 envelope glycoprotein gene, partial cds. e envelope (E) protein [Dengue virus 4] NP_740317.1).

3.2.1 Primers – DENV-2 e DENV-4

Os *primers* forward e reverse para DENV-2 e DENV-4 foram utilizados nas combinações abaixo:

Tabela 2 - *Primers* utilizados para amplificação do DENV-2 e DENV-4 e suas respectivas temperaturas de desnaturação.

Forward primer	Reverse primer	Combinação	Temperatura de desnaturação (melting temperature)
DE2-F3	DE2-R2	DE2-F3R2	DE2-F3 (56,42°C) DE2-R2(59,35°C)

DE2-F4	DE2-R3	DE2-F4R3	DE2-F4 (63,73°C) DE2-R3(59,83°C)
DE4-F2	DE4-R2	DE4-F2R2	DE4-F2 (59,82°C) DE4-R2(63,14°C)
DE4-F3	DE4-R3	DE4-F3R3	DE4-F3 (63,73°C) DE4-R3(64,43°C)

Sequências nucleotídicas dos *primers*:

DE2-F3: A ATG CGT TGC ATA GGA ATT TCA AAT

DE2-R2: GA GCT ATG GTG CAG GCT TGA

DE2-F4: GTG GGG AGG CAA GAG AAA GGG

DE2-R3: CGC CAT CAA CTT TGG CAA GAG

DE4-F2: A ATG CGA TGC GTA GGA GTA GG

DE4-R2: G GGC TTC ACA GTT GGC GCC

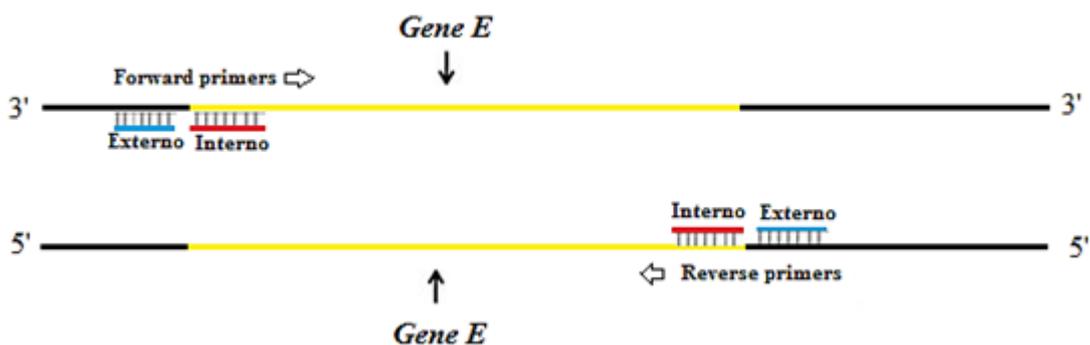
DE4-F3: CCT AAT GAT GCT GGT CGC CCC

DE4-R3: GGA TGC GCC ATC AAC TTT GGC AAG

3.2.2 A mistura de reação e os tipos de PCR realizados

É importante ressaltar que a combinação de *primers* DE2-F4R3 e DE4-F3R3 inicia a síntese no gene prM (gene da glicoproteína precursora da membrana), externamente ao gene E (*primers* externos), comparado à combinação DE2-F3R2 e DE4-F2R2 (*primers* internos), que iniciam e terminam a síntese diretamente no gene E.

Figura 10 – Esquematização dos *primers* externos e *primers* internos utilizados na amplificação do gene E.



A tabela 3 abaixo mostra todos os arranjos de reação feitos na PCR do gene E, com os respectivos *primers* e DNA template:

Tabela 3 – Combinações de *primers* e arranjos de reação da PCR do gene E.

DNA (template)	<i>Primers</i>
DENV-2	DE2-F3R2 (<i>primers</i> internos)
DENV-2	DE2-F4R3 (<i>primers</i> externos)
Produto de PCR (DE2-F4R3)	DE2-F3R2 (<i>primers</i> internos)
DENV-4	DE4-F2R2 (<i>primers</i> internos)
DENV-4	DE4-R3F3 (<i>primers</i> externos)
Produto de PCR (DE4-F3R3)	DE4-F2R2 (<i>primers</i> internos)

As seqüências nucleotídicas de parte do genoma de DENV-2 e DENV-4, assim como a localização dos *primers* internos e externos selecionados para amplificação do gene E no genoma encontra-se em **APÊNDICE B** e **APÊNDICE C**, respectivamente.

Esta técnica é denominada *Nested PCR*. Haja vista que seriam utilizados fragmentos de DNA maiores - resultantes da PCR dos *primers* externos – como template, o gene E teria mais chances de sucesso na amplificação, aumentando a sensibilidade da técnica.

Além disso, a aplicação da *Nested PCR* possibilita, frequentemente - mas não sempre - a obtenção de maior quantidade de produto final amplificado – neste caso, o gene E - provenientes tanto da amplificação com os *primers* externos, quanto da amplificação com os *primers* internos utilizando o produto da PCR anterior como template.

As mesmas quantidades para mistura de reação descritas anteriormente foram utilizadas para este procedimento, conforme descrito no abaixo:

- 39,5 µl H₂O;
- 5 µl Tampão;
- 1,5 µl MgCl₂ (concentração – 50mM);
- 1 µl dNTPs (concentração – 10mM);
- 0,5 µl DNA (template);
- 1 µl Forward primer (concentração – 20mM);
- 1 µl Reverse primer (concentração – 20mM);
- 0,5 µl Taq polimerase.

3.3 Termociclador

3.3.1 Temperatura de anelamento

A temperatura para anelamento dos *primers* foi estabelecida de acordo com a fórmula para o cálculo da temperatura média de desnaturação dos mesmos (*melting temperature*):

$$TM = 69,3 + GC\% \times 0,41 - (650 : N)$$

Onde,

TM = temperatura de desnaturação (*melting temperature*)

CG% = porcentagem de citosina e guanina na sequência nucleotídica do *primer*

N = total de nucleotídeos no *primer*

Para programação do termociclador e realização de todas as PCRs num mesmo programa, o valor para temperatura de anelamento (55°C) foi determinada de forma que estivesse abaixo da menor temperatura média de desnaturação dentre os *primers*, portanto, abaixo de 56,42°C (DE2-F3).

3.3.2 Programação do termociclador

Todas as amplificações dos DNAs (DENV-2, DENV-4, pGEX-2T) com seus respectivos *primers* e componentes, nas devidas quantidades, ocorreram num mesmo ciclo de programação do termociclador, conforme mostrado na tabela 4:

Tabela 4 - Programação dos ciclos de temperatura em termociclador da PCR, para amplificação do gene E da dengue e do vetor de clonagem pGEX-2T.

	Início	30 ciclos			Fim	
Temperatura	94°C	<i>Desnaturação do DNA</i>	<i>Anelamento dos primers</i>	<i>Polimerização</i>	72°C	4°C
		94°C	55°C	72°C		
Tempo (segundos)	60s	30s	30s	90s	300s	∞

3.4 Eletroforese

Para a separação e visualização dos fragmentos amplificados pela técnica de PCR, realizou-se a eletroforese em gel. A agarose foi selecionada por conter maiores poros em sua matriz, sendo mais adequada para separação de fragmentos maiores (200-5000 pares de base), como é o caso dos segmentos amplificados neste trabalho (aproximadamente 1500 pares de base do gene E; 1146 pares de base do plasmídeo vetor pGEX-2T).

O gel de agarose foi preparado na proporção a 1% (0,5g de agarose – 50 mL de tampão TAE 1x). O TAE 1x foi obtido a partir da diluição: 20 mL de TAE 50x em 980 mL de H₂O_{bidest.}, conforme descrição a seguir:

TAE 50x:

242 g Tris-base

57,1 ml ácido acético

100 mL EDTA 5,0M

842,9 mL H₂O_{bidest} (até completar 1L)

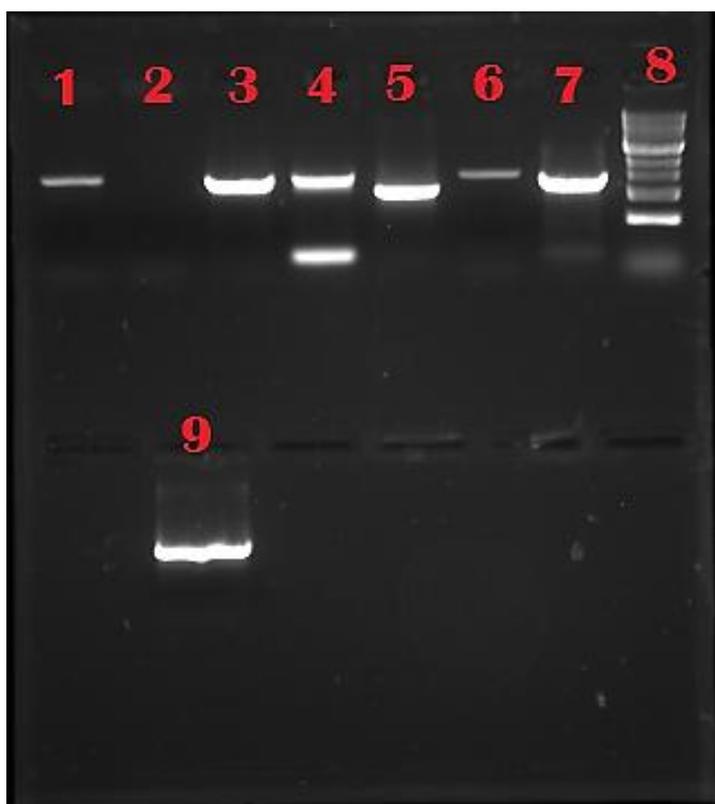
Na preparação do gel, enquanto este se encontrava ainda no estado líquido, incluiu-se 2µl de SYBR Safe™ (Invitrogen) para possibilitar a visualização dos fragmentos em luz UV com uso de transiluminador.

A separação ocorreu sob campo elétrico de 50-70 V, 45min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado das amplificações por PCR separadas em gel de agarose podem ser visualizadas na figura 11:

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose, mostrando resultado da amplificação de DNA por PCR. O poço 8 corresponde ao marcador de peso molecular, com fragmentos de tamanhos em pares de base e em ordem decrescente iguais a: 10.000 pb; 8.000 pb; 6.000 pb; 5.000 pb; 4.000 pb; 3.000 pb; 2.000 pb; 1.500 pb; 1.000 pb; 500 pb e 100 pb. Os trechos amplificados aparecem nitidamente nos poços 3, 4, 5 e 7; e fracamente nos trechos 1 e 6. Nada foi amplificado no poço 2.



Para melhor compreensão, a tabela 5 abaixo descreve a mistura de componentes da PCR correspondente a cada número ilustrado na figura:

Tabela 5 – Mistura de componentes da PCR correspondente a cada poço, como indicado na figura 11.

PCR	DNA	Primers	Tamanho esperado
1	DENV-2	DE2-F3R2 (internos)	1488 pb
2	DENV-2	DE2-F4R3 (externos)	1976 pb
3	DENV-4	DE4-F2R2 (internos)	1486 pb

4	DENV-4	DE4-F3R3 (externos)	1546 pb
5 e 9	pGEX-2T	pGEX-F2R2	1146 pb
6	PCR 2	DE2-F3R2 (internos)	1488 pb
7	PCR 4	DE4-F2R2 (internos)	1486 pb
8	Marcador	-	-

Os tamanhos esperados para os fragmentos amplificados correspondiam à:

- **DENV-2**: 1976 pb e 1488 pb utilizando os *primers* externos (DE2-F4R3) e *primers* internos (DE2-F3R2), respectivamente;
- **DENV-4**: 1546 e 1486 pb utilizando os *primers* externos (DE4-F3R3) e *primers* internos (DE4-F2R2), respectivamente;
- **Vetor pGEX-2T**: 1146 pb para a amplificação do fragmento do vetor pGEX-2T utilizando os *primers* pGEX-F2R2.

Como pode ser visto na figura 11 correspondente à eletroforese em gel de agarose, o tamanho dos fragmentos que foram amplificados com sucesso, correspondem ao tamanho esperado de cada trecho.

Nos **PCR's 6 e 7**, em que foram utilizados os produtos de **PCR 2 e PCR 4**, respectivamente, como DNA template (Nested PCR) e os *primers* internos, houve produção de fragmentos de tamanhos correspondentes ao das amplificações dos **PCR's 1 e 3** (DENV-2 e DENV-4 como template, e *primers* internos) nesta ordem, como também era esperado.

No **PCR 4** com a combinação da molécula de DNA de DENV-4 e *primers* externos, observam-se duas bandas, quando o previsto seria o aparecimento de apenas uma. Este resultado indica que pelo menos um dos *primers* fez um anelamento em local errôneo.

É possível observar que no **PCR 2** (Template: DENV-2, *primers* externos) não houve amplificação. Já nos **PCR 1** (Template: DENV-2, *primers* internos) e **PCR 6** (Template: PCR 2, *primers* internos) obtiveram amplificação de tamanho esperado, embora tenham sido mais fracamente amplificados em comparação aos demais.

Isso indicaria possíveis problemas na mistura de reação:

→ O resultado visto no **PCR 2** evidencia que não houve produção de cópias do fragmento de DENV-2 utilizando os *primers* externos selecionados. Isso pode ser corroborado

pelo fato de que os **PCR's 1 e 6** possuem exatamente a mesma intensidade, realçando que apenas os *primers* internos, mas não os *primers* externos de DENV-2 funcionaram.

→ Além dos problemas citados com os *primers*, a fraca amplificação também pode ter sido causada possivelmente por má qualidade no template DENV-2.

Apesar dos resultados obtidos para molécula de DNA do sorotipo-2, é possível utilizar o produto da amplificação com os *primers* internos na etapa de inserção do gene E no vetor de clonagem.

Os fragmentos de amplificação correspondentes à molécula de DNA de DENV-4, ao produto de PCR de DENV-4 e pGEX-2T puderam ser fortemente visualizados, confirmando a obtenção de inúmeros cópias do DNA que se buscou amplificar em cada reação, como objetivou o presente trabalho. Assim, é possível afirmar que a técnica para PCR desenvolvida para estes fragmentos no trabalho foi satisfatória.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho estabeleceu técnicas para amplificação do gene E dos sorotipos virais 2 e 4 da dengue, assim como para amplificação de um fragmento do vetor de clonagem pGEX-2T. Uma vez determinadas, as técnicas da amplificação do gene E são imprescindíveis nas etapas de obtenção de DNA recombinante no processo de clonagem e expressão da proteína E da dengue.

A PCR estabelecida para DENV-2, assim como para DENV-4, foi mais bem sucedida ao se utilizar a combinação de *primers* internos para amplificação.

Outras técnicas precisam ser realizadas até expressão da proteína E, incluindo as etapas ligação do gene E amplificado ao plasmídeo, a transformação de bactérias com o vetor plasmídeo contendo o DNA recombinante, e a expressão e purificação da proteína E quimérica resultante do transgene, com controle da expressão em Western Blot.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON J.D., **Biologia Molecular da Célula**. 5a Edição, Artmed, 2009.

ALCARAZ-ESTRADA, Sofia Lizeth; YOCUPICIO-MONROY, Martha; DEL ANGEL, Rosa María. Insights into dengue virus genome replication. **Future Virology**, v. 5, n. 5, p. 575-592, 2010.

ARAÚJO, Herbert Crisóstomo dos Santos. **Amplificação do vetor de clonagem pGEX-2t em células E. coli quimio-competentes e digestão do vetor com a enzima de restrição Sma I**. 2015.

ARAÚJO, Josélio Maria Galvão de. **Vírus dengue sorotipo 3 (DENV-3) no Brasil: estudos sobre patogenia, sítios de replicação, filogenia e evolução molecular**. 2016. Tese de Doutorado.

AZEVEDO, Adriana de Souza et al. **Desenvolvimento de vacinas de DNA contra o vírus da dengue baseadas na proteína do envelope viral**. 2011. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz.

BARBOZA, Morgana Maria de Oliveira. **Caracterização genômica do sorotipo 1 de vírus dengue isolados no Ceará no ano de 2011**. 2013.

BARROS, Lilian P. S. et al. Análise crítica dos achados hematológicos e sorológicos de pacientes com suspeita de Dengue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 363-366, Oct. 2008.

BARROS, Maria Creuza do Espírito Santo. **Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o Sistema Baculovírus de Expressão**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 80 p.

BRICKS, Lucia Ferro. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatria (São Paulo)**, v. 26, n. 4, p. 268-281, 2004.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. Artmed 4ed, 240p, 2003.

CARDOSA, M. J. Dengue vaccine design: issues and challenges. **British Medical Bulletin**, v. 54, n. 2, p. 395-405, 1998.

CARUSO, Celia Sulzbacher. **Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de Xylella fastidiosa**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHAMBERS, Thomas J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649-688, 1990.

CHAO, Luke H. et al. Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion. **Elife**, v. 3, p. e04389, 2014.

CHIANG, Chen-Yi et al. Lipidated dengue-2 envelope protein domain III independently stimulates long-lasting neutralizing antibodies and reduces the risk of antibody-dependent enhancement. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 9, p. e2432, 2013.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

CORDEIRO, Marli Tenório. **Evolução da dengue no estado de Pernambuco, 1987-2006: epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes**. 2008. Tese de Doutorado.

CRILL, Wayne D.; CHANG, Gwong-Jen J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **Journal of virology**, v. 78, n. 24, p. 13975-13986, 2004.

FLORES, N. et al. Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue. **Biotechniques**, n. 13, p. 203-205, 1992.

GUZMÁN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, London, p. S7-S16, 2010.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, Gustavo. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International journal of infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

HENCHAL, E. A. & PUTNAK, J. R. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews** v. 3 (4), p. 376-396, 1990.

JAISWAL, S.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN S. Replication-defective adenoviral vaccine vector for the induction of immune responses to Dengue virus type 2. **Journal Of Virology** v. 77 (23), p. 12907-12913, 2003.

KIM, Yong et al. The gene: the polymerase chain reaction and its clinical application. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 60, n. 7, p. 808-815, 2002.

KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Near-atomic resolution cryo-electron microscopic structure of dengue serotype 4 virus. **JournalofVirology**, v. 88, n. 1, p. 477-482, 2014.

LEITMEYER, Katrin C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, 1999.

LIMA, L.M. **Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular**. Embrapa Algodão, Campina Grande, 2008.

LUDWIG, Jordana Beatris. **Clonagem, expressão e produção de dna polimerase de alta fidelidade de pyrococcus furiosus**. 2010.

MACIEL, I. J.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. B.; MARTELLI, C. M. T. **Epidemiologia e desafios no controle do dengue**. Revista de Patologia Tropical, Goiânia, v. 37, n.2, 2008.

MONDINI, Adriano et al. Spatio-temporal tracking and phylodynamics of an urban dengue 3 outbreak in Sao Paulo, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 5, p. e448, 2009.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.

MUKHOPADHYAY, Suchetana; KUHN, Richard J.; ROSSMANN, Michael G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.

MURRELL, Sarah; WU, Suh-Chin; BUTLER, Michael. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 2, p. 239-247, 2011.

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.

NASCIMENTO, Alexandra AC et al. **Tecnologia do DNA recombinante**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, p. 85, 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, André Silva de. **Expressão heteróloga do domínio III da proteína de envelope (E) do vírus dengue-1 e 2 em *Pichia pastoris***. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2011.

OLIVEIRA, Anibal Silva de. **Clonagem e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD; PAN AMERICAN SANITARY BUREAU; PAN AMERICAN SANITARY BUREAU STAFF. **Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control**. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 1995.

PAIXÃO, Vinicius Ferreira da. **Construção e expressão heteróloga de domínio III da proteína de envelope (E) dos vírus dengue-1e-3 em *Pichia pastoris***. 2014.

PINHO, Aryane Cruz Oliveira. **Diagnóstico e caracterização molecular do vírus dengue circulante na cidade de Salvador, Bahia, Brasil**. 2013.

POLONI, Telma Regina Ramos Silva. **Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biociências Aplicadas à Farmácia, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2009.

SAUTTO, Giuseppe et al. Possible future monoclonal antibody (mAb)-based therapy against arbovirus infections. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SILVA, Ana Maria da. **Caracterização molecular dos vírus dengue circulantes em Pernambuco: implicações epidemiológicas**. 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

SHRESTHA, Bimmi et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000823, 2010.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS, Flaviviridae. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/43.html>. Acesso em 02 de Setembro de 2016.

UHLMANN, V. et al. In cell amplification. **Molecular Pathology**, v. 51, n. 3, p. 119, 1998.

WEAVER, R. F. **Molecular biology**. Lawrence: University of Kansas, 2001. 880 p.

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

WHITEHEAD, Stephen S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

YAP, Thai Leong et al. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. **Journal of virology**, v. 81, n. 9, p. 4753-4765, 2007.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Luciane MP. **Biologia Molecular Básica-5**. Artmed Editora, 2014.

ZHANG, Wei et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 10, n. 11, p. 907-912, 2003.

**APÊNDICE A - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO VETOR pGEX-2T,
FRAGMENTO AMPLIFICADO E LOCALIZAÇÃO DOS PRIMERS**

Sequência nucleotídica completa do genoma circular do vetor pGEX-2T, totalizando 4948 pb:

- O fragmento amplificado do vetor (destacado em **amarelo**) contém 1146 pb e os respectivos *primers* utilizados para esta amplificação encontram-se **sublinhados e em negrito**.

```

ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTG
GTATGGCTGTGCAGGTCGTAATCACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGT
TCTGGATAATGTTTTTTCGCGCCGACATCATAACGGTTCGTCGCAAATATTCTGAAATGAGCT
GTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCCAC
ACAGGAAACAGTATTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCA
ACCCACTCGACTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCG
CGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCT
TCCTTATTATAATTGATGGTGATGTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACTGTTATATA
GCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTT
GAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTT
GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTTCAAGAT
CGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGT
ATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTT
AGTTTGTTTTAAAAACGTATTGAAGCTATCCCAAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAG
CAAGTATATAGCATGGCCTTTCAGGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCC
TCCAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCCCCGGGAATTCATCGTGAAGTACTGACGAT
CTGCCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAG
CGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTG
TATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGA
TAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCT
ATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGAT
AAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCC
TTATTCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCCTGTTTTTIGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAA
GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAAC
AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT
AAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT
CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCAT
CTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAC
ACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTG
CACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC
ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA
ACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGA
GGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCT
GATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGAT
GGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA
CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGAC
CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCT
AGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCA
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGC
GCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGG

```

ATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAA
ATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCACCGCC
TACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGT
CTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAAC
GGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAACC
TACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCAGGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT
CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACG
CCTGGTATCTTTATAGTCCTGTTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTG
ATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTT
CCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGG
ATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGC
GCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGC
ATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATAAATTCGGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTC
GCGGTATGGCATGATAGCGCCCGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCA
GTAACGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCAGTGG
TGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCG
GAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTG
ATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTCGCGGCGATT
AAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTTCGATGGTAGAACGAAGCGG
CGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGAT
CATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGT
TCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCAT
GAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATTGGGTCACCAGCAAATCGC
GCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAA
ATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCA
TGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCCTGCGATGC
TGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGC
GCGTTGGTGCAGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATA
TCCCGCCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACC
GCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCAC
TGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGG
CCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGC
AACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTC
CGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATG
ACCATGATTACGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGC
GTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTT
GCCTGGTTTTCCGGCACCAAGCGGTGCCGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAG
GCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTAC
ACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACG
GGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGA
ATTATTTTTGATGGCGTTGGAATT

(Referências: pGEX-2T cloning vector, complete sequence.; GenBank: U13850.1)

APÊNDICE B - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DE DENV-2 E LOCALIZAÇÃO DOS PRIMERS NO GENOMA VIRAL

Parte da sequência nucleotídica do gene DENV-2, onde está incluído o gene E:

- *Gene prM* (**amarelo**), onde o *primer* forward externo inicia a síntese;
- *Gene E* (**azul**), onde os *primers* internos forward e reverso iniciam e terminam a síntese;
- Parte do genoma que codifica a *proteína não-estrutural NS1* (**cinza**): nela, está localizado o *primer* reverso externo utilizados para amplificação do gene E.
- Os *primers* externos (**sublinhados e em negrito**), e os *primers* internos (**negrito**).

```

TTCCATTTAACCACACGTAATGGAGAACCACACATGATCGTGGGGAGGCAAGAGAAAG
GGAAAAGTCTTCTGTTCAAAACAGAGGATGGTGTCAACATGTGCACCCTCATGGCCATAG
ACCTGGTGAATTGTGTGAAGATACAATCACGTACAAGTGTCCCCTCCTCAGGCAAAATG
AACCAGAAGACATAGATTGTTGGTGCAACTCTACGTCCACATGGGTAACCTATGGGACAT
GTACCACCACAGGAGAACACAGAAGAGAAAAAAGATCAGTGGCACTCGTTCCACATGTG
GGTATGGGACTGGAGACACGAACTGAAACATGGATGTCATCAGAAGGGGCCTGGAACA
TGTTTCAGAGAATTGAAACCTGGATCTTGAGACATCCAGGCTTTGCCATAATGGCAGCAAT
CCTGGCATAACCCATAGGAACGACACATTTCCAAAGGGCCTTGATTTTCATCTTACTGAC
AGCTGTCGCTCCTTCAATGACAATGCGTTGCATAGGAATTTCAAATAGAGACTTCGTAG
AAGGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGACATAGTCTTAGAACATGGAAGTTGTGTGACG
ACGATGGCAAAAAATAAACCAACATTGGATTTTGAAGTATAAAAAACAGAAGCCAAACA
ACCTGCCACTCTAAGGAAGTACTGTATAGAAGCAAAGCTGACCAATACAACAACAGAAT
CTCGTTGCCAACACAAGGGGAACCCAGTCTAAATGAAGAGCAGGACAAAAGGTTTCATC
TGCAAACACTCCATGGTAGACAGAGGATGGGGAAATGGATGTGGATTATTTGGAAAAGG
AGGCATTGTGACCTGTGCTATGTTACATGCAAAAAGAACATGGAAGGAAAAGTTCGTGCT
GCCAGAAAATCTGGAATACACCATCGTGATAACACCTCACTCAGGAGAAGAGCACGCTG
TAGGTAATGACACAGGAAAACATGGCGAGGAAATCAAATAACACCACAGAGTTCCATC
ACAGAAGCAGAAGTACAGGCTATGGCACTGTCACGATGGAGTGCTCTCCGAGAACGGG
CCTCGACTTCAATGAAATGGTGTGCTGCTGCAGATGGAAGAGAAAGCTTGGCTGGTGCACAG
GCAATGGTTCTAGACCTGCCATTACCATGGCTACCCGGAGCGGACACACAAGGATCAA
TTGGATACAGAAAGAGACATTGGTCACTTTCAAAAATCCCCACGCGAAGAAACAAGATG
TCGTTGTTTTAGGATCTCAAGAAGGGGCCATGCACACGGCACTCACAGGGGCCAAAAA
ATCCAGTTGGCAATCAGAACTTACTGTTACAGGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGAATG
GACAACTACAGCTCAAAGGAATGTCATACTCTATGTGTACAGGAAAGTTTAAAATTGTG
AAGGAAATAGCAGAAACACAACATGGAACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGA
CGGCTCTCCATGTAAGATCCCTTTTGGAGATAATGGATTTGGAAAAAGACACGTCTTAGG
TCGCCTGATTACAGTTAACCCAATCGTAACAGAAAAAGATAGCCCAGTCAACATAGAAG
CAGAACCTCCATTTCGGAGACAGCTACATCATATAGGAGTAGAGCCGGGACAATTGAAA
CTCAATTGGTTTAAAGAAGGGAAGTTCATCGGCCAAATGTTTGGAGACAACAATGAGAGG
AGCGAAGAGAATGGCCATATTAGGTGACACAGCCTGGGATTTGGATCCCTGGGAGGAG
TGTTTACATCTATAGGAAAGGCTCTCCACCAAGTTTTCGGAGCAATCTATGGGGCTGCTT
TAGTGGGGTCTCATGGACTATGAAAATCCTCATAGGAGTCATCATCATGGATAGGAAT
GAATTCACGTAGCACCTCACTGTCTGTGTCAGTATTGGTGGGAGTCGTGACACTGTA
CCTGGGAGCTATGGTGCAGGCTGATCAAGGATGCGCCATCAACTTTGGCAAGAGAGA
GCTCAAGTGCAGGAGATGGTATCTTCATATTTAGAGACTCTGATGACTGGCTGAACAAGTA

```

APÊNDICE C - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DE DENV-4 E LOCALIZAÇÃO DOS PRIMERS NO GENOMA VIRAL

Parte da sequência nucleotídica do gene DENV-4, onde está incluído o gene E:

- *Gene prM* (**amarelo**), onde o *primer* forward externo inicia a síntese;
- *Gene E* (**azul**), onde os *primers* internos forward e reverso iniciam e terminam a síntese;
- Parte do genoma que codifica a *proteína não-estrutural NS1* (**cinza**): nela, está localizado o *primer* reverso externo utilizados para amplificação do gene E.
- Os *primers* externos (**sublinhados e em negrito**), e os *primers* internos (**negrito**).

```

AGACCTCTCTTGTTTAAGACAACAGAGGGGATCAACAAATGCACTCTCATTGCCATGGAC
TTGGGTGAAATGTGTGAGGACACTGTCACGTATAAATGCCCCCTACTGGTCAATACCGAA
CCTGAAGACATTGATTGCTGGTGCAACCTCACGTCTACCTGGGTCATGTATGGGACATGC
ACCCAGAGCGGAGAACGGAGACGAGAGAAGCGCTCAGTAGCTTTAACACCACATTCAGG
AATGGGATTGGAAACAAGAGCTGAGACATGGATGTCATCGGAAGGGGCTTGGAAGCATG
CTCAGAGAGTAGAGAGCTGGATACTCAGAAACCCAGGATTCGCGCTCTTGGCAGGATTTA
TGGCTTATATGATTGGGCAAACAGGAATCCAGCGAACTGTCTTCTTCGTCCTAATGATGC
TGGTCGCCCCATCCTACGGAATGCGATGCGTAGGAGTAGGAAACAGAGACTTTGTGG
AAGGAGTCTCAGGTGGAGCATGGGTGACCTGGTGCTAGAACATGGAGGATGCGTCACA
ACCATGGCCCAGGGAAAACCAACCTTGGATTTTGAAGTACTAAGACAACAGCCAAGGA
AGTGGCTCTGTAAAGAACCTATTGCATTGAAGCCTCAATATCAAACATAACTACGGCAAC
AAGATGTCCAACGCAAGGAGAGCCTTATCTGAAAGAGGAACAGGACCAACAGTACATT
GCCGGAGAGATGTGGTAGACAGAGGGTGGGGCAATGGCTGTGGCTTGTTTGGAAAAGGA
GGAGTTGTGACATGTGCTAAGTTTTCATGTTTCGGGGAAGATAACAGGCAATTTGGTCCAA
ATTGAGAACCTTGAATACACAGTGGTTGTAACAGTCCACAATGGAGACACCCATGCAGTA
GGAAATGACACATCCAATCATGGAGTTACAGCCATGATAACTCCCAGGTCACCATCGGTG
GAAGTCAAATTTCCGGACTATGGAGAATAACACTCGATTGTGAACCCAGGTCTGGAATT
GACTTTAATGAGATGATTCTGATGAAAATGAAAAGAAAACATGGCTCGTGCATAAGCA
ATGGTTTTTGGATCTGCCTCTTCCATGGACAGCAGGAGCAGACACATCAGAGGTTCACTG
GAATTACAAAGAGAGAATGGTGACATTTAAGGTTCCCTCATGCCAAGAGACAGGATGTGA
CAGTGCTGGGATCTCAGGAAGGAGCCATGCATTCTGCCCTCGCTGGAGCCACAGAAGTGG
ACTCCGGTGATGGAAATCACATGTTTGCAGGACATCTCAAGTGCAAAGTCCGTATGGAGA
GATTGAGAATCAAGGGAATGTCATACACGATGTGTTTCAGGAAAGTTTTCAATTGACAAAG
AGATGGCAGAAACACAGCATGGGACAACAGTGGTGAAAGTCAAGTATGAAGGTGCTGGA
GCTCCGTGTAAAGTCCCCATAGAGATAAGAGATGTAAACAAGGAAAAGTGGTTGGGCG
TATCATCTCATCCACCCCTTGGCTGAGAATACCAACAGTGTAACCAACATAGAATTAGA
ACCCCTTTGGGGACAGCTACATAGTGATAGGTGTTGGAAACAGCGCATTAACTCCA
CTGGTTCAGGAAAGGAGTTCATTGGCAAGATGTTTGAGTCCACATACAGAGGTGCAAA
ACGAATGGCCATTCTAGGTGAAACAGCTTGGGATTTTGGTTCGTTGGTGGACTGTTTAC
ATCATTGGGAAAGGCTGTGCACCAGGTTTTTGGAAAGTGTGTACACAACCATGTTTGGAGG
AGTCTCATGGATGATTAGAATCCTAATTGGGTTCTTAGTGTTGTGGATTGGCACGAACTCA
AGGAACTTCAATGGCTATGACGTGCATAGCTGTTGGAGGAATCACTCTGTTTCTGGGC
TTCACAGTTGGCGCCGATCAAGGATGCGCCATCAACTTTGGCAAGAGAGAGCTCAAG

```

(Referências: Dengue virus 4 isolate BR/SJRP/850/2013, complete genome.; GenBank: KP188566.1)