



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

HERBERT CRISÓSTOMO DOS SANTOS ARAÚJO

**AMPLIFICAÇÃO DO VETOR DE CLONAGEM pGEX-2T EM CÉLULAS *E. COLI*
QUIMIO-COMPETENTES E DIGESTÃO DO VETOR COM A ENZIMA DE
RESTRIÇÃO Sma I**

**CAMPINA GRANDE
2015**

HERBERT CRISÓSTOMO DOS SANTOS ARAÚJO

**AMPLIFICAÇÃO DO VETOR DE CLONAGEM pGEX-2T EM CÉLULAS *E. COLI*
QUIMIO-COMPETENTES E DIGESTÃO DO VETOR COM A ENZIMA DE
RESTRIÇÃO Sma I**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Mathias Weller

**CAMPINA GRANDE
2015**

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.

A659a Araújo, Herbert Crisóstomo dos Santos.
Amplificação Do Vetor Pgex-2t [manuscrito] : Amplificação do vetor de clonagem pgex-2t em células E. coli quimio-competentes e digestão do vetor com a enzima de restrição Sma I / Herbert Crisóstomo dos Santos Araújo. - 2015.
40 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

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

1. Dengue. 2. Clonagem. 3. pGEX2-T. 4. Proteína E. I.
Título.

21. ed. CDD 616.921

HERBERT CRISÓSTOMO DOS SANTOS ARAÚJO

AMPLIFICAÇÃO DO VETOR DE CLONAGEM pGEX-2T EM CÉLULAS *E. COLI*
QUIMIO- COMPETENTES E DIGESTÃO DO VETOR COM A ENZIMA DE
RESTRIÇÃO Sma I

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Licenciatura em Ciências Biológicas.

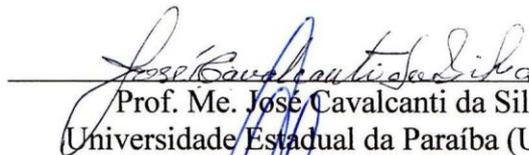
Área de concentração: Genética.

Aprovada em: 10/12/2015

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Me. José Cavalcanti da Silva
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Walclécio Morais Lira
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

À minha família, da qual herdei quem sou, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, especialmente minha mãe M^a Salete dos Santos Araújo, que sempre me incentivou e apoiou durante todo o difícil percurso da minha formação.

Ao professor Dr. Mathias Weller, pela oportunidade de participar desta pesquisa, pela dedicação ao longo desta orientação e por todo o aprendizado que me ajudou a alcançar tanto no laboratório como em sala de aula.

Às colegas de laboratório Beatriz Dantas, Hortência Gabriele e Ruth Buriti, pela colaboração, incentivo e participação em todas as fases deste trabalho, bem como às técnicas do laboratório.

Aos professores do Curso de Licenciatura em Ciência Biológicas da UEPB, que deixaram cada um sua contribuição durante a graduação, especialmente aqueles com os quais tive oportunidades de colaboração ou mesmo se tornaram inesquecíveis incentivadores, inclusive de Francisco Ramos de Brito, Érica Oliveira, Shirley Germano, José Iranildo Melo, Osmundo Claudino, Avany Gusmão e André Pessanha, pelos exemplos e ensinamentos.

À Fiocruz, pelo fornecimento do template de DNA utilizado.

A Roseane Almeida, pela paciência e carinho com que tem me acompanhado durante meu aprendizado.

Aos meus amigos do curso, especialmente aqueles com os quais compartilhei atividades de laboratório e em campo, incluindo Felipe Torres, Francisco Siqueira da Silva, Manoel Costa, Pablo Barros, Thaynara Sousa Silva, Wallyson Queiroz e tantos outros que participaram e ainda participam da minha caminhada acadêmica e pessoal, pelo aprendizado e amizade.

Enfim, a todos aqueles que acreditaram, apoiaram e contribuíram para que cada fase da pesquisa e da graduação fosse realizada da melhor maneira possível.

“A verdadeira racionalidade, aberta por natureza, dialoga com o real que lhe resiste. Opera o ir e vir incessante entre a instância lógica e a instância empírica” (Edgar Morin)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer procedimentos necessários à clonagem e expressão da proteína E da dengue. Realizou-se amplificação *in vitro* do gene da proteína E dos sorotipos 2 e 4 da dengue por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). A digestão do vetor de clonagem pGEX-2T foi realizada com a enzima de restrição Sma I com a subsequente remoção de fósforo das extremidades 5' do vetor digerido utilizando-se fosfatase alcalina. Foram geradas células quimio-competentes a partir de *Escherichia coli* BL21, as quais foram posteriormente transformadas com a utilização do vetor pGEX-2T por meio de choque térmico. A PCR para o gene da proteína E apresentou necessidade de otimização. A digestão do vetor com a enzima Sma I ocorreu conforme esperado, bem como a geração de células quimio-competentes e a transformação bacteriana. Com a realização da presente pesquisa, foi possível estabelecer procedimentos até então não disponíveis para esta linha de pesquisa na Universidade Estadual da Paraíba.

Palavras-Chave: Dengue. Clonagem. pGEX-2T.

ABSTRACT

The objective of the study was to establish procedures necessary to the cloning and expression of E protein of dengue virus. In vitro amplification of E protein gene from serotypes 2 and 4 of dengue virus was performed by means of polymerase chain reaction (PCR). Digestion of the pGEX-2T vector cloning was accomplished with the Sma I restriction enzyme and subsequent removal of phosphorus 5' extremities of the digested vector was carried out using alkaline phosphatase. Chemically competent cells were generated from E. coli BL21, and were afterwards transformed through heat shock using the pGEX-2T vector. The PCR for E protein gene needed further optimization. Digestion of the vector with Sma I enzyme occurred as expected, likewise the generation of chemically competent cells and bacterial transformation. After this very investigation was completed, it became possible to establish procedures previously unavailable to this research stream in the Universidade Estadual da Paraíba.

Keywords: Dengue. Cloning. pGEX-2T.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vetor pGEX-2T	25
Figura 2 – Eletroforese – PCRs	30
Figura 3 – Eletroforese – Digestão do vetor pGEX-2T.....	31
Figura 4 – Eletroforese – Vetor recuperado de células transformadas	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Programa de PCR – Dengue tipos 2 e 4	23
Tabela 2 – Programa de PCR – Controle	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DENV	Vírus da dengue
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
FD	Febre comum da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GST	Glutathione S-Transferase
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LACEN	Laboratório central
LB	Meio de cultura Lauria-Bertani
MAC ELISA	ELISA de anticorpos monoclonais
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
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
Proteína C	Proteína da capsídeo
Proteína E	Proteína do envelope
prM	Precursor da proteína da membrana
Proteína M	Proteína da membrana
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de PCR
ssRNA	Ácido ribonucléico de fita simples

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
L	Litro
M	Molaridade
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
min	Minuto
seg	Segundo
rpm	Rotações por minuto
UV	Luz ultravioleta
V	Volt
μl	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Origem geográfica e sorotipos	14
2.2	Estrutura do vírus e etiologia da infecção	15
2.3	Diagnóstico da infecção	15
2.3.1	<i>Diagnóstico laboratorial</i>	18
2.3.2	<i>Diagnóstico molecular por PCR</i>	18
2.3.3	<i>Isolamento viral</i>	19
2.3.4	<i>ELISA</i>	19
2.3.5	<i>Deteção da proteína NS1</i>	20
3	METODOLOGIA	22
3.1	PCR	22
3.2	Eletroforese	23
3.3	Digestão do vetor pGEX-2T	24
3.4	Purificação do vetor digerido	26
3.5	Células competentes	27
3.6	Transformação de células competentes	28
3.7	Purificação do vetor plasmídeo a partir das bactérias	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	PCR	30
4.2	Digestão do vetor	31
4.3	Transformação de células competentes	32
5	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença aguda, sistêmica e tem como agentes etiológicos arbovírus do gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), dos quais são conhecidos cinco sorotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5, mas apenas os quatro primeiros apresentam importância epidemiológica até o momento (BARROS et al., 2008; MACIEL et al., 2008; MUSTAFA et al., 2015). De acordo com Dias et al. (2010) o vírus é transmitido principalmente pela picada dos mosquitos *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*, sendo este último o vetor responsável pelos surtos epidemiológicos no Brasil, onde apresenta grande impacto na saúde pública (PESSANHA et al., 2010).

A virose tem representado um problema de saúde pública de grande evidência no Brasil nas últimas décadas (PESSANHA et al., 2010). A distribuição da virose impõe dificuldades ao seu controle e pesquisas para traçar seu perfil epidemiológico vêm sendo empreendidas no país além de buscas pelo controle a nível internacional (MACIEL et al. 2008).

Segundo Torres & Castro (2007), a virose apresenta aspectos que variam geograficamente, como a faixa etária mais atingida, além de quadros clínicos variados que vão desde casos assintomáticos até graves, como a febre hemorrágica da dengue (FHD), a qual pode levar a óbito e está associada principalmente à resposta imunológica em casos de reinfecção por sorotipo diferente do que causou a primeira infecção (MONGKOLSAPAYA et al., 2003).

O diagnóstico molecular tem sido um dos principais avanços no combate à mortalidade por dengue e o ensaio imunossorbente ligado à enzima (ELISA), aliado à expressão recombinante de polipeptídeos imunogênicos e anticorpos monoclonais, tem apresentado novas possibilidades de diagnóstico, embora esta estratégia (por clonagem) ainda seja pouco explorada no Brasil (GUZMÁN & KOURÍ 2004; MARTINS et al., 2014; RODRIGUEZ-ROCHE & GOULD, 2013).

A distinção do sorotipo infectante é importante, pois os casos graves de dengue estão geralmente associados a infecções subsequentes por sorotipo diferente daquele responsável pela infecção anterior, mas esta distinção através de PCR ou isolamento viral é difícil e a proteína NS1, apesar da sua especificidade, possui baixa sensibilidade (CARDOSA, 1998;

BRASIL, 2013). Além de demandar tempo e alto custo financeiro, devido às condições de infra-estrutura exigidas para sua realização, o diagnóstico molecular encontra-se principalmente relacionado às capitais e cidades pólo, não possuindo aplicação descentralizada sendo geralmente inviáveis nos hospitais ou laboratórios convencionais (LICKS, 2013).

No presente trabalho, foram realizados testes necessários a clonagem do gene da proteína E da dengue, incluindo a amplificação do gene da proteína E dos sorotipos 2 e 4, geração de células quimiocompetentes, e a transformação bacteriana com vetor de clonagem pGEX-2T, além da digestão do vetor.

O objetivo final do projeto, que envolve várias etapas, é o desenvolvimento de um teste imunodiagnóstico de MAC ELISA rápido e barato onde se possam distinguir os 4 diferentes sorotipos do vírus com importância epidemiológica na atualidade com anticorpos monoclonais produzidos a partir da proteína E. O desenvolvimento do teste se dará em cooperação com o departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). O trabalho aqui apresentado é parte dos procedimentos necessários à clonagem e expressão da proteína E do DENV, cuja realização está em andamento nas dependências da Central de Laboratórios Três Marias, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB.

Os procedimentos realizados neste trabalho envolvem a amplificação do gene da proteína E por PCR, cujos produtos foram visualizados em gel de agarose a 1%; digestão do vetor de clonagem pGEX-2T pela enzima de restrição Sma I, visando sua linearização no sítio onde será inserido o gene da proteína E; geração de células quimiocompetentes a partir de cultivo de *Escherichia coli* BL21 e transformação bacteriana, na qual o vetor de clonagem foi introduzido nas bactérias por meio de choque térmico, a fim de verificar a competência genética das bactérias e também como meio de amplificação do vetor dentro das próprias bactérias.

Até que a proteína seja finalmente expressa, ainda serão necessárias as seguintes etapas: I - Adição de fósforo ao plasmídeo digerido e ligação do gene amplificado ao plasmídeo; II - Transformação bacteriana com plasmídeo contendo transgene; III - Isolamento e sequenciamento do plasmídeo de diferentes clones; IV – Expressão e purificação da proteína GST-Proteína E; V – Controle da proteína com Western blot.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem geográfica e sorotipos

Nas Américas, o único transmissor do vírus da dengue com importância epidemiológica é o mosquito *Aedes aegypti* (L), uma espécie cosmopolita (BARRETO & TEIXEIRA, 2008). Apesar da ocorrência de *Aedes albopictus* no continente americano, sua capacidade como vetor inter-humano em dengue epidêmica nas Américas é controversa (DEGALLIER et al., 2003; DIAS et al., 2010). *A. aegypti* é um díptero da família Culicidae, provavelmente originário da Etiópia, acompanhou muitas rotas de migração humanas dispersando-se para várias regiões, possui hábitos diurnos e alimenta-se por hematofagia, transmitindo o *Flavivirus* através de picadas das fêmeas em período reprodutivo (HIRAGI et al., 2009).

A origem do vírus é atribuída a macacos da Malásia, entre os quais se encontram vírus geneticamente semelhantes ao da dengue (UJVARI, 2008). A origem dos tipos de vírus da dengue foi analisada por Wang et al. (2000), que sugeriram a origem independente dos tipos que divergiram a partir de ancestrais selvagens na ordem de 100 a 1500 anos atrás e houve adaptação para diferentes hospedeiros e vetores; visto que *A. Aegypti* provavelmente não ocorria na região quando a dengue emergiu, *A. albopictus* ou outros *Aedes* são mais prováveis como vetores iniciais. A evolução dos diferentes sorotipos foi novamente analisada por Twiddy et al. (2003), com ênfase nas taxas de substituição e datas de divergência no gene da proteína E com novos critérios de análise, como a exclusão de todas as sequências recombinantes conhecidas e aplicação do método de máxima verossimilhança (ML) para calibragem da história evolutiva do vírus a longo prazo considerando também a data de isolamento das amostras.

Estes autores estimaram que a transmissão da dengue silvestre (de macacos) para humanos ocorreu entre 125 e 320 anos atrás, bem como que a atual diversidade genética global nos quatro sorotipos do vírus da dengue apareceu durante o século passado, e que o recente aumento na diversidade genética global do vírus emerge no contexto das atividades humanas recentes como urbanização e deslocamento em massa, que têm favorecido a proliferação dos vetores e disseminação do vírus (TWIDDY et al., 2003).

2.2 Estrutura do vírus e etiologia da infecção

As proteínas estruturais do DENV são a proteína E, do envelope, a proteína da membrana (M), inserida na membrana lipídica do capsídeo é sintetizada como o precursor prM, enquanto a proteína do capsídeo (C) é altamente básica com afinidade para o genoma viral, que consiste em RNA de polaridade positiva com aproximadamente 11 Kb. Os determinantes antigênicos estão em sua maior parte contidos na proteína E, de fundamental importância para a adesão à superfície celular e endocitose mediada por receptor (ALCARAZ-ESTRADA et al., 2010).

O genoma do vírus é policistrônico e codifica a formação de uma única molécula que é posteriormente clivada por proteases celulares em sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e nas três proteínas estruturais C, prM e E (YAP et al., 2007). A entrada na célula hospedeira se dá por endocitose mediada por receptores da proteína E na superfície celular, em cujo processo há uma mudança conformacional na proteína E desencadeada pelo baixo pH do endossomo e o RNA viral é traduzido pelos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso (RER) das células infectadas (ALCARAZ-ESTRADA et al., 2010; GANDHAM et al., 2014).

A glicoproteína E do DENV constitui o antígeno primário que induz a fusão com a membrana e ligação a receptores celulares, além de afetar a gama de hospedeiros, o tropismo tecidual e virulência, com três domínios estruturais e funcionais (DI, DII e DIII) apresentando estrutura de barril beta, aos quais se relaciona a presença de regiões antigênicas e epitopos específicos (CRILL & CHANG, 2004). Dentre estes domínios, dois (DI e DII) são classicamente reconhecidos pela neutralização por anticorpos (SAUTTO et al., 2013). Trata-se da maior proteína estrutural que medeia a infecção pelo vírus e o domínio III é responsável pela ligação ao receptor celular (CHIANG et al., 2013). A expressão recombinante do domínio III, bem como sua possível aplicação em vacinas, têm se mostrado promissores, assim como o uso de anticorpos monoclonais específicos para a mesma proteína (RODRIGUEZ-ROCHE & GOULD, 2013).

A infecção pode ocorrer de modo assintomático ou sintomático, com a forma sintomática tendo duas formas clínicas principais: a febre clássica da dengue (FD), caracterizada por febre alta de início súbito, dores de cabeça, dor nos olhos, náuseas, vômitos, mialgia, artralgia, dor abdominal, calafrio e exantema; ou a mais grave, a febre hemorrágica

da dengue (FHD). Esta, com quadro clínico semelhante à FD, porém, com ocorrência de hemorragias, relacionadas com inflamações nos vasos que acarretam alto consumo de plaquetas. Como consequência do baixo número de plaquetas, é afetada a homeostasia do organismo, que passa a apresentar tendência a hemorragias gastrintestinais, cutâneas, gengivais e nasais juntamente com queda de pressão e tontura (PINHO, 2013).

A dengue hemorrágica (FHD) é relacionada com a resposta imunológica, quando considerada sua ocorrência em pacientes previamente imunizados que sofrem uma infecção sequenciais por um sorotipo diferente do vírus da dengue, culminando com o quadro clínico da FHD através de resposta imunológica secundária (CARDOSA, 1998). As infecções sequenciais tem se mostrado mais propensas a desenvolver a forma hemorrágica (FHD), por causa do envolvimento da reação cruzada de anticorpos não neutralizantes que ligam a infecção heteróloga anterior ao vírus na infecção secundária, facilitando a entrada nas células e aumentando o numero do antígeno (VAUGHN et al., 2000).

Dessa forma, a gravidade de uma segunda infecção por sorotipo diferente está relacionada à presença de anticorpos residuais de infecções anteriores que se ligam ao vírus, mas são incapazes de neutralizá-lo, de modo que o vírus envolvido por anticorpos tem mais facilidade para entrar na célula (SINGHI et al., 2007). Há registro de manifestações neurológicas da infecção pelo vírus da dengue, o que se acredita ser também uma consequência da resposta imunológica (ARAGÃO et al., 2010).

2.3 Diagnóstico da infecção

Mesmo com algumas vacinas em estudo, a necessidade de um diagnóstico mais eficaz para a dengue permanece, uma vez que a vacina mais avançada contra os sorotipos de importância epidemiológica, a vacina tetravalente da Sanofir Pasteur, ainda não apresenta garantias na imunização e não se sabe dos possíveis riscos de haver dispersão do quinto sorotipo entre humanos (MUSTAFA et al., 2015). Além disso, a complexa resposta imunológica do organismo humano à infecção continua sendo um grande desafio ao desenvolvimento de uma vacina capaz de resolver o problema da dengue, pois apesar da soroconversão da vacina tetravalente, a eficácia mostrou-se baixa (FLIPSE & SMIT, 2015).

Enquanto isso, Fibriansah et al. (2015), demonstraram que a proteína E continua sendo um importante foco no estudo da resposta imunológica à infecção por dengue devido ao importante papel que desempenha na interação antígeno-anticorpo, reforçando assim a importância da presente pesquisa, que visa utilizar os anticorpos para esta proteína em prol de um diagnóstico mais eficaz da doença e capaz de distinguir os sorotipos.

Sendo a redução da mortalidade por dengue um dos principais fatores no combate à doença (TAUIL, 2002), a busca por novas alternativas no diagnóstico representa um potencial avanço no combate à doença.

A ocorrência dos diagnósticos equivocados, os quais podem confundir a dengue com outras doenças tropicais, como a malária, é uma das dificuldades na compreensão e avaliação dos casos (GUBLER, 2011). De acordo com Carme et al. (2009), ambas as doenças não só são suspeitas em pacientes febris nas áreas onde elas ocorrem, como também há casos registrados de co-infecções de dengue e malária.

Houve também um importante aumento no número de casos de dengue clássica e FHD no Brasil, assim como na América Latina nas últimas décadas, provavelmente devido à circulação de novos sorotipos juntamente com diagnósticos equivocados (SIQUEIRA JR et al., 2005; TORRES & CASTRO, 2007).

Erros no diagnóstico clínico ocorrem pela não detecção da infecção por dengue em alguns pacientes, como apontam Martins et al. (2014). De Pina Costa et al. (2010), relatam a ocorrência de diagnóstico tardio de malária após diagnóstico clínico equivocado de dengue onde a mesma ocorre com frequência, evidenciando assim a necessidade de diagnósticos mais precisos.

De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2013), considera-se caso suspeito de dengue todo paciente que apresente doença febril aguda, com duração máxima de sete dias, acompanhada de pelo menos dois sintomas como cefaléia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, prostração ou exantema, com história epidemiológica positiva, tendo estado nos últimos 15 dias em área com transmissão de dengue ou que tenha a presença do *A. aegypti*. Seguindo tais recomendações, o diagnóstico clínico deve incluir anamnese detalhada para identificação de fatores associados à doença e exame físico geral, com verificação do estado de consciência, pulso (normal, débil ou ausente), sangramento de mucosas, grau de hidratação e frequência cardíaca, além dos sintomas supramencionados. São

suficientes, segundo Singhi et al. (2007) dois sintomas clínicos e um laboratorial para elaboração de um diagnóstico provisório de FHD. Elevação do hematócrito acima de 20% do valor basal e plaquetopenia (< 100.000 células/mm³) devem ser considerados e são detectáveis especialmente com acompanhamento desde os primeiros estágios da doença, sendo o diagnóstico clínico suficiente para iniciar o tratamento.

Para o diagnóstico laboratorial da infecção são utilizados, segundo Barros et al. (2008), exames inespecíficos como hemograma, coagulograma, provas de função hepática e dosagem de albumina sérica e específicos, como testes de isolamento viral e pesquisa de anticorpos, sendo este bastante utilizado por meio da detecção de níveis aumentados de IgM a partir do 6º dia de evolução da doença.

2.3.1 Diagnóstico laboratorial

Em laboratório, podem ser realizados para a investigação sorológica, imunoensaio enzimático (ELISA) para IgG e IgM, detecção do antígeno NS1Ag (proteína 1 não estrutural) do DENV na fase precoce da doença, isolamento viral, ou RT-PCR para diagnóstico molecular do sorotipo em casos graves (SILVA et al., 2014), sendo tais processos descritos a seguir. A confirmação laboratorial é importante para o manejo seguro de pacientes e identificação de sorotipos, de modo a dar maior precisão diagnóstica e informações para vigilância epidemiológica. Por isso, apresenta também um importante papel no combate à doença, tanto no aspecto epidemiológico como no que diz respeito ao contexto hospitalar (BRASIL, 2013).

2.3.2 Diagnóstico molecular por PCR

A detecção por RT-PCR pode diagnosticar precocemente a doença com identificação do sorotipo infectante, o que é possível utilizando-se primers sorotipo específicos para a região 5' do genoma viral (POLONI, 2009).

Porém a aplicação de PCR em diagnóstico requer condições muito específicas procedimentais e de infra-estrutura, de modo que poucos laboratórios estão aptos a fazê-lo

(LICKS, 2013). A amplificação de uma sequência específica de DNA por meio de PCR semelhante ao processo incluso na seção “METODOLOGIA” do presente trabalho.

2.3.3 Isolamento Viral

Testes de isolamento viral possuem grande relevância no diagnóstico laboratorial, tendo sido empregados em diferentes protocolos de diagnóstico em combinação com cultura de células e anticorpos monoclonais (FIGUEIREDO et al., 1992). Isto por ser especialmente importante combinando-se métodos imunológicos de identificação de cepas, as quais são reconhecidas por anticorpos monoclonais específicos para o sorotipo pesquisado com base na proteína NS1, mas estando a especificidade do isolamento viral relacionada com a amplificação *in vivo*, o exame torna-se demorado, levando até 11 dias (YOUNG et al. 2000).

O isolamento viral seguido de imunofluorescência indireta é a técnica considerada referência para detecção e identificação do DENV. Entretanto, esse procedimento apresenta importantes desvantagens na sua aplicação, uma vez que requer instalações apropriadas, apresenta custo elevado e demora cerca de 7 a 10 dias para ser concluído (SILVA et al., 2013).

2.3.4 ELISA

De acordo com Guzmán & Kourí (2004), a aplicação de ELISA para captura de IgM (MAC ELISA) foi um dos maiores avanços no diagnóstico da dengue e a busca por protocolos para a detecção de antígenos recentemente tem apontado novas e eficazes alternativas para o diagnóstico. Nesta perspectiva, se incluem o radioimunoensaio (RIA) e protocolos baseados em ELISA para a detecção da proteína 1 não estrutural (NS1).

As metodologias de diagnóstico, por si só, não resolvem o problema de saúde pública representado pela virose, pois como demonstra Gubler (2011), a dengue está atrelada a diversos fatores da dinâmica populacional, mas o diagnóstico tem importante papel no tratamento adequado de pacientes e na sua vigilância epidemiológica. Além disso, em nível de sistema, as informações referentes ao diagnóstico da doença apresentam vários problemas,

como dados imprecisos e digitações inadequadas, que dificultam a consulta aos dados e a vigilância epidemiológica da mesma no Brasil (LICKS, 2013).

O ensaio imunossorbente ligado à enzima (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) é um importante teste para a pesquisa sorológica e pode ser utilizado para detecção tanto de antígenos (ELISA direto) como de anticorpos (ELISA indireto), mostrando-se bastante eficaz e rápido (TORTORA et al., 2012). Em estudo feito por Martins et al. (2014) em crianças na Amazônia, verificou-se a eficiência do diagnóstico por ELISA sem distinção de sorotipos. Os autores observaram que a maioria das crianças que possuíam anticorpos para a dengue, não havia tido diagnóstico clínico por um profissional da saúde nem reconhecimento da doença pelos familiares, demonstrando a dificuldade na detecção das infecções de dengue e a importância do estabelecimento de novos critérios de diagnóstico.

A realização de imunodiagnóstico laboratorial da dengue por ELISA, embora seja aplicável, consiste principalmente a ELISA indireto (cujo resultado negativo não descarta a possibilidade de infecção) embora também haja kits para Elisa direto especialmente para a proteína NS1, como alternativa à RT-PCR ou isolamento viral e, de acordo com os dados atuais para o Brasil, esses são os principais métodos de diagnóstico laboratorial, realizados nos laboratórios centrais (LACEN) de capitais ou cidades pólo (MARTINS et al., 2014; LICKS, 2013, SILVA et al. 2011; SILVA et al., 2014). No Brasil, a aplicação de ELISA indireto (captura de IgM específica para dengue) no imunodiagnóstico foi utilizada para dengue epidêmica já na década de oitenta, no Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al, 1988). Dittmar et al. (1979) apontaram limitações na aplicação de ensaio de imunoabsorção ligado à enzima indireto para a captura de IgM, enquanto (MARTIN et al., 2000) afirmam que a não captura de IgM em infecções recentes, pode indicar não a ausência da infecção, mas uma resposta imunológica inicial insuficiente.

2.3.5 Detecção da proteína NS1

Sendo secretada por células infectadas *in vitro* e *in vivo*, a proteína NS1 parece ser importante para a ancoragem do complexo de replicação na membrana do retículo endoplasmático (HANG et al., 2009). Encontra-se associada a organelas celulares durante a replicação viral ou é alternativamente transportada através da via secretora para a superfície celular; uma forma hexamérica solúvel pode ser libertada de uma forma dependente da

glicosilação de células de mamíferos infectadas, encontrando-se NS1 circulante no soro de doentes durante a fase aguda da doença (ALCON et al., 2002).

O antígeno tem se mostrado importante no diagnóstico da dengue e seus níveis parecem estar associados com a gravidade da doença, havendo altos níveis em casos de FHD (PARANAVITANE et al., 2014). É feito um teste qualitativo, usado na detecção do antígeno NS1 da dengue pela técnica ELISA de captura; auxilia no diagnóstico sorológico da doença em amostras colhidas principalmente até o terceiro dia do início dos sintomas; o ideal é que a amostra seja colhida no primeiro dia dos sintomas, o que, muitas vezes, permitirá a liberação do resultado antes do momento da defervescência da febre; seu desempenho é equivalente ao do RT-PCR, porém, não permite a identificação do sorotipo (BRASIL, 2013).

Anticorpos monoclonais para NS1 apresentaram proteção *in vivo*, enquanto soro policlonal e anticorpos monoclonais para as proteínas prM e E, se mostraram capazes de neutralizar o vírus da dengue *in vitro*, além disso, a identificação de resíduos da proteína E envolvidos na neutralização e reação cruzada com anticorpos, têm sido matéria de muitas pesquisas (CLYDE et al., 2006). A maioria dos anticorpos neutralizantes do vírus são, de acordo com CARDOSA (1998), contra epitopos específicos da proteína E. A estrutura do envelope viral, bem como 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 (KOSTYUCHENKO et al., 2014).

3 METODOLOGIA

O processo de clonagem requer a combinação de diferentes técnicas de Biologia Molecular, desde a amplificação do gene de interesse por PCR até a inserção do plasmídeo com o gene da proteína E em *E. coli* e sua expressão nas bactérias. Os métodos já empregados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos a seguir.

3.1 PCR

O DNA abrangendo o gene da proteína E do vírus da Dengue, utilizado no presente trabalho, foi fornecido pela FIOCRUZ em Recife. A técnica de PCR foi aplicada para amplificação do gene da proteína E, que contém cerca de 1500 pares de bases, levando em consideração os 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) bem como na literatura (AMARILLA et al., 2009).

Na PCR para amplificação do gene da proteína E, foram utilizados os primers forward DE2-f2 (A ATG CGT TGC ATA GGA ATA TC) e reverse DE2-r1 (TTA AGC CTG CAC CAT AGC TCC C) para dengue 2; forward DE4-f1 (G ATG CGA TGC GTA GGA GTA GG) e DE4-r1 (TTA CGC TTG AAC CGT GAA GCC C) para dengue 4, os quais foram incluídos nos respectivos mix de reação, conforme encontra-se descrito abaixo.

20,5 µl H₂O;
3 µl Tampão;
1,5 µl dNTP;
1 µl DNA (template);
1,5 µl Primer forward;
1,5 µl Primer reverse;
1 µl Taq polimerase.

A reação ocorreu em termociclador conforme o programa mostrado na Tabela 1, abaixo:

	Início	35 ciclos			Fim	
Temperatura	94°C	94°C Abertura do DNA	52,5 °C Anelamento dos primers	72 °C Polimerização	72 °C	4 °C
Tempo	2 min.	1 min.	1 min.	2 min.	5 min.	∞

Tabela 1. Programa de ciclos de temperatura utilizado para PCR de amplificação do gene da proteína E da dengue.

Como controle, foi utilizado PCR já testado de microssatélite, descrito a seguir juntamente com seu programa de ciclos de temperatura, na Tabela 2. No mix de reação do controle mostrado abaixo, foram testados a Taq polimerase, o dNTP e o tampão utilizados na amplificação do gene da proteína E da dengue.

9,26 µl H₂O;
 1,25 µl Tampão;
 0,23 µl dNTP;
 0,28 µl Primer farward;
 0,28 µl Primer reverse;
 1,0 µl DNA template;
 0,2 µl Taq polimerase.

	Início	30 ciclos			Fim
Temperatura	94°C	94 °C Abertura do DNA	55 °C Anelamento dos primers	72 °C Polimerização	72 °C
Tempo	5 min.	30 seg.	30 seg.	30 seg.	5 min.

Tabela 2. Programa de ciclos de temperatura utilizado para PCR de controle.

3.2 Eletroforese

Para a separação dos fragmentos amplificados por PCR neste trabalho, foi feita eletroforese em gel de agarose a 1%. Assim, o gel continha proporção de 1g de agarose para

cada 100ml de TAE (1x, preparado a partir do TAE 50x como descrito abaixo) ou 0,60g de agarose para 60 ml de TAE, com o gel correndo sob campo elétrico de 80 V.

TAE 50x:

242 g Tris-base

57,1 ml ácido acético

100 ml EDTA 5,0M

842,9 ml H₂O_{bidest} (até completar um litro)

TAE 1x obtido pela diluição de 20 ml de TAE 50x em 980 ml H₂O_{bidest}.

Para visualização dos fragmentos em luz UV com uso de transiluminador foram incluídos 2µl de SYBR Safe no gel ainda em estado líquido. Para eletroforese do PCR de controle bem como do vetor recuperado das células transformadas, a concentração de agarose foi de 1,8% visando melhor distinção das bandas.

3.3 Digestão do vetor pGEX-2T

O vetor de clonagem utilizado, pGEX-2T, consiste em uma molécula de DNA circular que inclui a sequência CCCGGG, reconhecida para corte pela enzima de restrição Sma I (Figura 1).

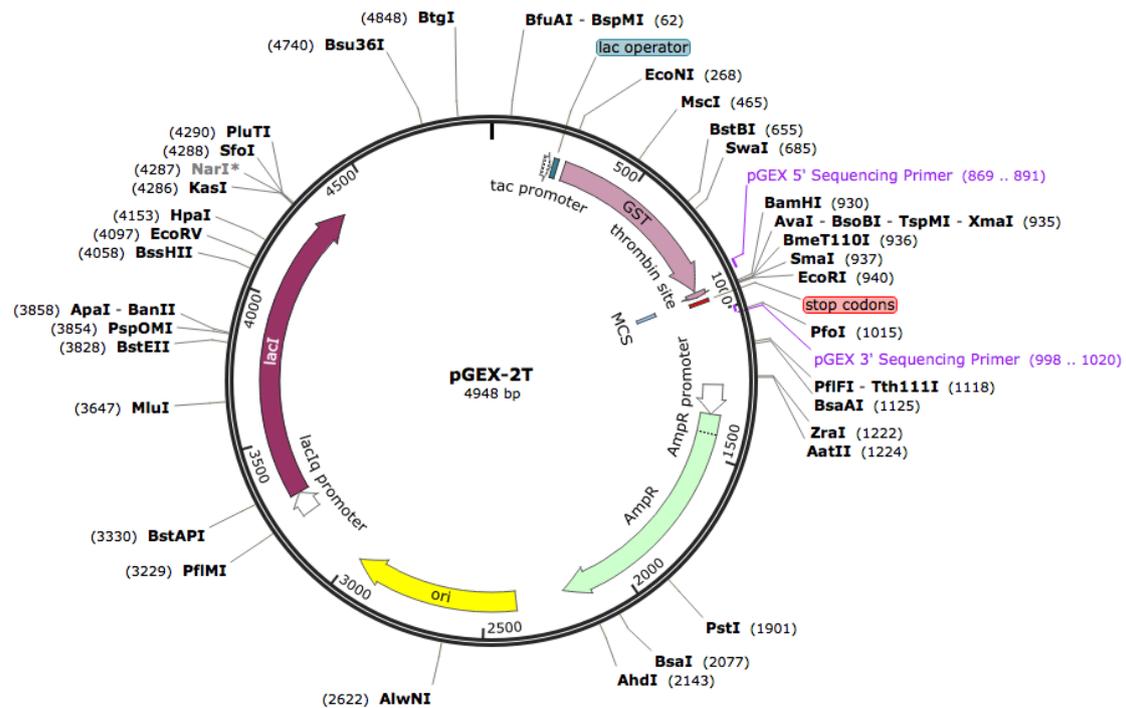


Figura 1. Vetor pGEX-2T, com sequência reconhecida pela enzima Sma I em posição adjacente ao gene da glutationa S-transferase. Pode-se ver também a região que confere a resistência à ampicilina.

A digestão para linearização do vetor foi feita com a enzima Sma I, cujo protocolo é descrito abaixo.

- 14 µl H₂O;
- 2 µl Vetor;
- 2 µl Enzima Sma I;
- 2 µl Tampão de Sma I.

A mistura de reagentes acima descrita foi então incubada a 30°C por 2 horas para a digestão do vetor pela enzima Sma I. Após a digestão, o vetor foi purificado.

3.4 Purificação do vetor digerido

Foi utilizado o QUIAGEN gel extraction kit, pulando o passo da excisão de um fragmento de gel. Para purificar o vetor foram utilizados, no tubo onde foi feita a digestão, os seguintes reagentes:

20 µl Vetor digerido;
20 µl Isopropanol
300 µl Tampão QG

1. Misturados e postos numa coluna (QUIAGEN).
2. Centrifugação a 13000 rpm por 1 min.
3. Adição de 750 µl do tampão PE (QUIAGEN) na coluna
4. Centrifugação a 13000 rpm por 1 min.
5. Trocar o tubo. Adição de 50 µl H₂O_{bidest} na coluna e deixando em repouso (2) min.
6. Centrifugação a 13000 rpm por 1 min.

Amostra colocada em um gel

Após purificação do vetor digerido, foi feita remoção do fósforo das extremidades 5' pela fosfatase alcalina, um procedimento complementar à digestão para impedir a religação vazia (sem o gene de interesse) das extremidades livres do vetor linearizado, mantendo o vetor apto à inserção do transgene. O procedimento utilizado no presente trabalho para a remoção do fosfato da extremidade 5' do vetor pGEX-2T é descrito a seguir.

50 µl Vetor pGEX-2T purificado;
6 µl Tampão;
3 µl Enzima fosfatase alcalina;
1 µl H₂O.

Para atuação da enzima, os reagentes foram incubados a 37°C por 1 hora e posteriormente foi feita nova purificação, conforme o protocolo descrito anteriormente.

3.5 Células competentes.

Para a geração de células competentes, as bactérias *E. coli* BL21 foram cultivadas inicialmente por uma noite a 37 °C em LB (c=0,02g/ml) sem antibiótico para formação de cultura inicial, a partir da qual foram geradas células competentes pelo método abaixo. Em todo o processo se usou material estéril e autoclavado para eliminar possíveis agentes contaminantes como outras bactérias ou fungos. Para a ressuspensão das células se usou uma pipeta eletrônica. Todo o trabalho foi realizado em gelo e os passos de centrifugação em temperatura de 4°C. Se não indicado diferente, os volumes aplicados para a ressuspensão foram cada vez aprox. 250ml.

1 - Foram inoculados 10 ml da cultura inicial em LB para crescer a 37 °C em agitação moderada até que a turvação do meio indicasse crescimento bacteriano, conferido a cada hora. Com esta cultura inicial se inoculou 4 x 250ml de cultura crescido durante uma noite.

2 - A cultura já crescida foi posta no gelo por meia hora com agitações ocasionais ao longo do arrefecimento, dividida em quatro partes e centrifugadas a 3000 G por 15 min a 4 °C. Decante do sobrenatante.

3 - Para colher as células, estas foram posteriormente colocadas em suspensão com cloreto de magnésio (MgCl₂) a 0,1 M.

4 - Novamente colhidas por centrifugação a 2000 G por 15 min a 4 °C, com decantação do sobrenatante formado.

5 - A ressuspensão das células em CaCl₂ 85 mM e centrifugação nas mesmas condições de temperatura do ciclo anterior.

6 - Nova ressuspensão em CaCl_2 85 mM e glicerol a 15%, a qual foi realizada também sobre o gelo conforme a etapa precedente.

7 - Novamente as células foram ressuspensas em 2 ml de CaCl_2 85 mM e glicerol a 15%. Aliquotas de 50 μl foram armazenadas no refrigerador.

3.6 Transformação de células competentes

Realizou-se a transformação das células por meio de choque térmico retirando-as do gelo para o banho-maria a 42°C por 45 segundos e posterior crescimento em meio de recuperação Soc (80 ml) contendo o vetor pGEX-2T, para que pudesse ser testada a competência genética das bactérias para a clonagem gênica; a seleção das células transformadas baseou-se no cultivo das bactérias em meio seletivo contendo ampicilina, à qual o vetor confere resistência, o que permitiu obter a amplificação do plasmídeo nas próprias bactérias.

3.7 Purificação do vetor plasmídeo a partir das bactérias

A recuperação do plasmídeo a partir das células transformadas foi feita com a utilização do kit QIAGEN Plasmid Mini Kit.

1 - Foi inoculada uma cultura de 100ml com bactérias transformadas (veja ponto 5) no meio de crescimento LB contendo antibiótico seletivo (ampicilina) cujo crescimento se deu a 37°C para recuperação das células por centrifugação a 6000 G por 15 min a 4°C.

2 - As células colhidas foram colocadas em ressuspensão em solução de 0,3 ml de tampão contendo RNA e LyseBlue, seguido da adição do tampão P2 para lise celular no gelo por 5 min.

3 - Após homogeneização, adicionou-se 150 µl do tampão P3 induzindo diminuição da viscosidade e formação de precipitado contendo DNA, com a mistura sendo centrifugada a 13000 rpm por 10 min, recuperando-se o sobrenatante contendo DNA.

4 - Nas colunas QIAGEN-tip 20, foi adicionado 1 ml de tampão QBT (esvaziando-se por fluxo de gravidade) seguido do sobrenatante, cuja entrada na resina da coluna também se deu por fluxo de gravidade.

5 - Foi em seguida feita lavagem da coluna com 2 x 2 ml de tampão QC sendo o DNA eluído com 0,8 ml de tampão QF.

6 - O DNA precipitado acrescido de isopropanol (0,56 ml de por 0,8 ml de eluição) foi então centrifugado a 10000 rpm por 30 min formando pellet lateralmente no fundo do tubo.

7 - Uma vez removido o sobrenatante, o pellet foi lavado com 1 ml de etanol 70% e centrifugado a 10000 rpm por 10 min para remoção de sais.

8 - Após decantamento do sobrenatante, obteve-se o plasmídeo purificado deixando-se secar por 10 min para volatilização do etanol.

9. Se resolveu o DNA do vetor plasmídeo em 50 µl de H₂O_{bidest}.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PCR

O tamanho do material já amplificado, de acordo com o que foi mostrado pela eletroforese em gel de agarose, corresponde em tamanho ao trecho de DNA de interesse (contendo cerca de 1500 pares de bases), o qual codifica para a proteína E, conforme pode ser visto na Figura 2 (abaixo).

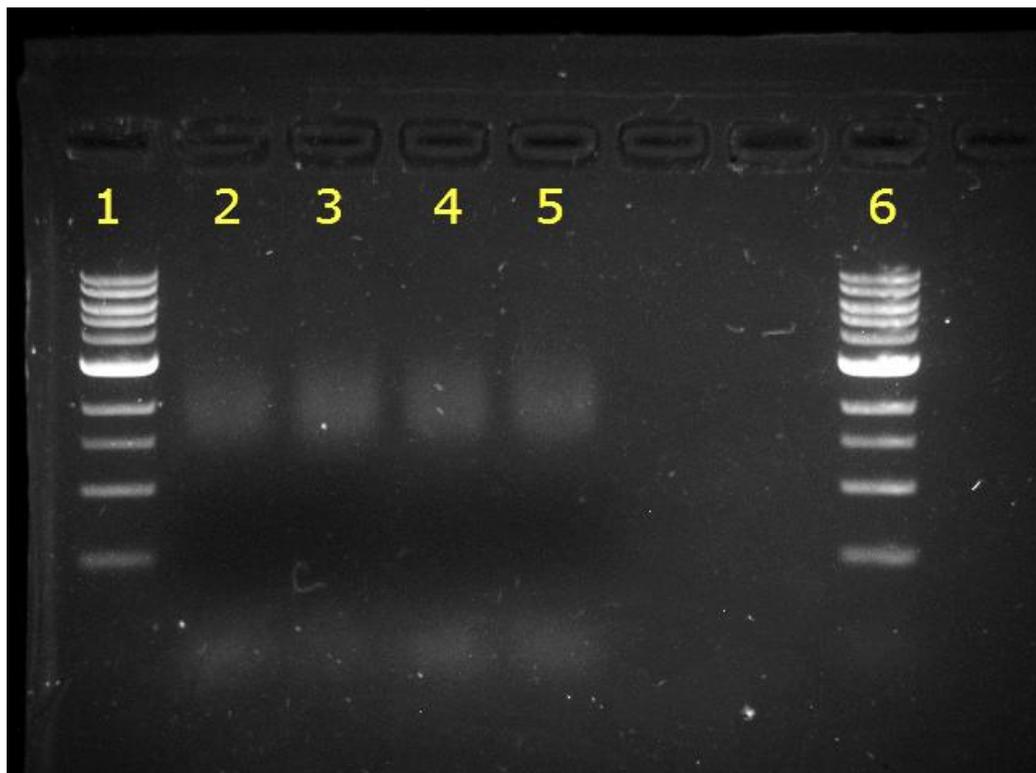


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose, mostrando resultado da amplificação de DNA por PCR. Poço 1 – marcador de peso molecular com fragmentos de tamanhos em kilobase (kb) e em ordem decrescente iguais a: 10,0; 8,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5. O trecho amplificado aparece fracamente nos poços 2 a 5, correspondendo aos PCRs do gene da proteína E da dengue tipo 2 (poços 2 e 3) e dengue tipo 4 (poços 4 e 5); poço 6 – marcador.

Os resultados obtidos por PCR apontam a necessidade de otimização da reação em cadeia da polimerase para melhores resultados no processo de clonagem gênica. Testes com diferentes controles positivos indicaram possíveis problemas no template utilizado, resultando em discreta amplificação.

A inserção do gene de interesse no plasmídeo requer ainda amplificação mais precisa para posterior transformação das bactérias por meio do plasmídeo recombinante.

4.2 Digestão do vetor

A digestão do vetor pela enzima Sma I resultou na linearização esperada. Enquanto permanece como molécula circular, o vetor apresenta comportamento variável na eletroforese em gel, pois pode assumir diferentes conformações que resultam na formação de um número variável de bandas, ao passo que sendo linearizado pela digestão, forma apenas uma banda (Figura 3).

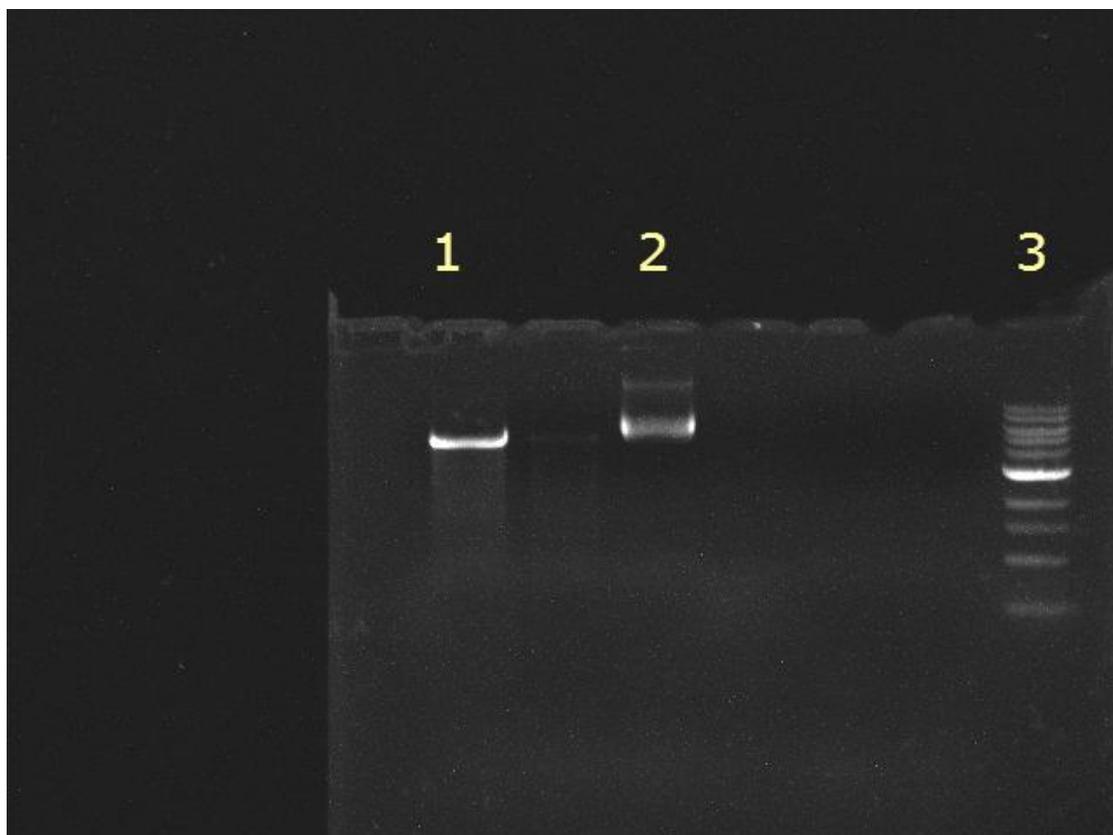


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose mostrando: 1 – O comportamento do vetor pGEX-2T após digestão com enzima Sma I e tratamento com fosfatase alcalina, formando uma única banda no gel. 2 – O vetor que não passou por digestão, forma mais de uma banda devido às diferentes conformações decorrentes de sua estrutura circular. 3 – Marcador de peso molecular com fragmentos de tamanhos em kilobase (kb) e em ordem decrescente iguais a: 10,0; 8,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5.

A linearização do vetor demonstrou a correta digestão pela enzima Sma I, uma vez que o seu comportamento na eletroforese mostra-se diferenciado antes de depois do tratamento com a enzima. O uso do vetor não digerido pela enzima Sma I como controle na eletroforese justifica-se, uma vez que apresenta forma circular e em consequência disso, tende a formar número variável de bandas, diferindo do vetor linearizado. Assim, controle da digestão por meio de eletroforese em gel bidimensional permite verificar o comportamento do vetor linearizado e não linearizado, sendo uma técnica há muito aplicada com esta finalidade (ITO et al., 1983).

Controle semelhante tem sido utilizado na digestão de vetores em diferentes procedimentos de clonagem e expressão de genes em microrganismos, combinando digestão enzimática e eletroforese em gel de agarose (FERRO, 2011; SHENG, 1995; SHIZUYA, 1992).

4.3 Transformação de células competentes

Com a transformação bem-sucedida das células de *E. coli* BL21, demonstrou-se o sucesso na geração de células competentes ao mesmo tempo em que foi possível obter-se a amplificação do vetor através das próprias bactérias.

O crescimento das bactérias no meio contendo ampicilina, cuja resistência é conferida pelo vetor de clonagem pGEX-2T utilizado na transformação, consistiu no primeiro indício de que as mesmas haviam internalizado o plasmídeo. Com a extração do vetor (ver “Purificação do vetor plasmídeo através das bactérias”, na METODOLOGIA) e realização da eletroforese mostrada na Figura 4, foi possível observar a presença do plasmídeo nas células que passaram pela transformação. Deste modo, obteve-se a confirmação da geração de células quimiocompetentes para transformação a partir de DNA exógeno e também um meio para a obtenção de mais cópias do vetor pGEX-2T através do cultivo das células transformadas.

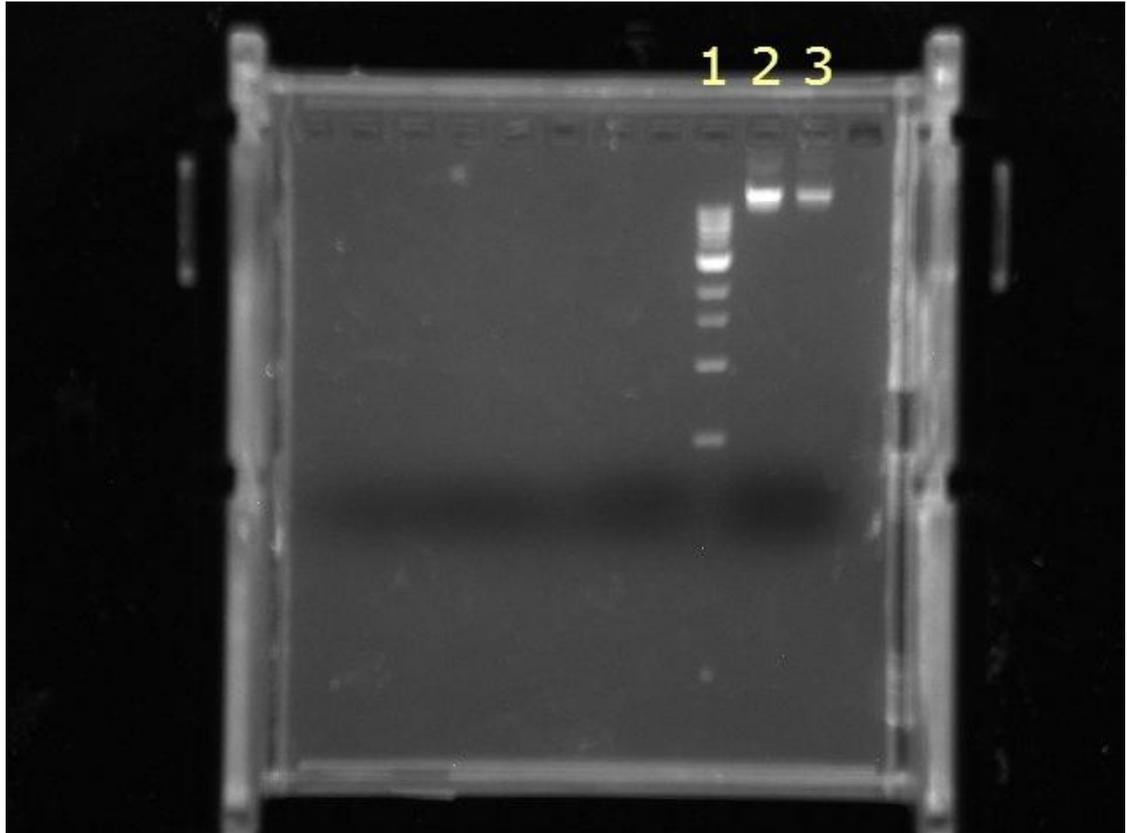


Figura 4. Imagem de eletroforese apresentando 1 – Marcador de peso molecular com fragmentos de tamanhos em kilobase (kb) e em ordem decrescente iguais a: 10,0; 8,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5. 2 e 3 – Vetor recuperado a partir das células de *E. coli* BL21 transformadas.

A presença de uma origem de replicação autônoma no plasmídeo permite sua multiplicação independente da multiplicação bacteriana, permitindo assim a obtenção de muitas cópias do vetor em uma única célula hospedeira, enquanto a resistência conferida pelo plasmídeo permite a seleção das células transformadas (LIMA, 2008).

Ainda serão necessárias importantes etapas até a conclusão do projeto como um todo. Entretanto, com o vetor digerido e as células competentes já disponíveis, se dispõe de importantes subsídios às próximas etapas, quais sejam a melhora nos resultados da amplificação do gene da proteína E e sua ligação ao plasmídeo já digerido e desfosforilado, para que se possa finalmente inserir o vetor pGEX-2T recombinante nas bactérias visando expressão e isolamento da proteína E. A próxima etapa será a ligação de um fragmento de DNA, amplificado por PCR, no vetor digerido com Sma I, e subsequentemente a amplificação

deste plasmídeo pelas células competentes. A recuperação do plasmídeo permitiria o controle do DNA inserido por PCR, Sequenciamento e/ou a aplicação de enzimas de restrição.

CONCLUSÃO

Com este trabalho, foram estabelecidos protocolos para importantes etapas do processo de clonagem e expressão da proteína E da dengue em *E. coli*. Alguns procedimentos ainda não haviam sido realizados na Universidade Estadual da Paraíba. Assim, o presente trabalho também contribuiu para a disponibilidade destas técnicas na instituição, abrindo possibilidade de realização de novos trabalhos. A PCR, embora tenha indicado a amplificação do gene de interesse, ainda requer otimização. A linearização do vetor pela enzima de restrição Sma I, mostrou-se eficiente, assim como a geração de células competentes e a transformação bacteriana com o vetor pGEX-2T por meio de choque térmico.

Dada a complexidade do processo de clonagem, outras etapas e técnicas precisam ser realizadas até expressão da proteína E, incluindo a adição de fósforo ao plasmídeo digerido e ligação do gene amplificado ao plasmídeo; transformação bacteriana com plasmídeo contendo transgene; isolamento e sequenciamento do plasmídeo de diferentes clones; expressão e purificação da proteína quimérica GST-Proteína E, assim como o controle da proteína expressa com Western blot.

REFERÊNCIAS

- ALCARAZ-ESTRADA, S. L.; YOCUPICIO-MONROY, M.; DEL ANGEL, R. M. Insights into dengue vírus genome replication. **Future Virology**, v. 5, n. 5, p. 575-592, 2010.
- ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.
- AMARILLA, A. A. et al. Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. **Virology Journal**, v. 6, p. 113, 2009.
- ARAGÃO, R. E. M. et al. Bilateral optic neuritis after dengue viral infection: case report. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** 73.2: 175-178, 2010.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.
- BARROS, L. P. S. et al. Análise crítica dos achados hematológicos e sorológicos de pacientes com suspeita de dengue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 363-366, 2008.
- 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.
- CARDOSA, M. J. Dengue vaccine design: issues and challenges. **British Medical Bulletin**, v. 54, n. 2, p. 395-405, 1998.
- CARME, B. et al. Concurrent dengue and malaria in cayenne hospital, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 668, 2009.
- CHIANG, C. Y. et al. Lipidated dengue-2 envelope protein domain III independently stimulates long-lasting neutralizing antibodies and reduces the risk of antibody-dependent enhancement. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 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.

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

DE PINA COSTA, A. et al. Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 571-574, 2010.

DEGALLIER, N. et al. Aedes albopictus may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 386-387, 2003.

DIAS, L. B. A. et al. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina (Ribeirao Preto Online)**, v. 43, n. 2, p. 143-152, 2010.

DITTMAR, D.; CLEARY, T. J.; CASTRO, A. Immunoglobulin G-and M-specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of dengue antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 498-502, 1979.

FERRO, T. **Estudo da expressão da proteína Tau humana em células de levedura.** Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica e Biofísica – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa 2011.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Estudo sobre diagnóstico laboratorial e sintomas do dengue, durante epidemia ocorrida na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, p. 121-30, 1992.

FLIPSE, J.; SMIT, J. M. The complexity of a dengue vaccine: A review of the human antibody response. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, n. 6, p. e0003749, 2015.

FIBRIANSAH, G. et al. Cryo-EM structure of an antibody that neutralizes dengue virus type 2 by locking E protein dimers. **Science**, v. 349, n. 6243, p. 88-91, 2015.

GANDHAM, S. H. A. et al. Thioaptamers targeting dengue virus type-2 envelope protein domain III. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 453, n. 3, p. 309-315, 2014.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: the unholy trinity of the 21st century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 3-11, 2011.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

HANG, Vu Ty et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 1, p. 1-7, e360, 2009.

HIRAGI, C. Variabilidade genética em populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 542-47, 2009.

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

LICKS, J. G. S. **Caracterização da investigação laboratorial de casos suspeitos de dengue no estado de Goiás**. 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

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

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

MARTIN, D. A. et al. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1823-1826, 2000.

MARTINS, A. C. P., et al. Seroprevalence and Seroconversion of Dengue and Implications for Clinical Diagnosis in Amazonian Children. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2014, 2014.

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.

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.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 2, p. 219-225, 1988.

PARANAVITANE, S. A. et al. Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 570, 2014.

PESSANHA, J. E. M. et al. Dengue em três distritos sanitários de Belo Horizonte, Brasil: inquérito soropidemiológico de base populacional, 2006 a 2007. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, p. 252-8, 2010.

PINHO, A. C. O. **Diagnóstico e caracterização molecular do vírus dengue circulante na cidade de Salvador, Bahia.** (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal da Bahia, Brasil. 2013.

POLONI, T. R. R. S. **Deteção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real.** 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

RODRIGUEZ-ROCHE, R; GOULD, E. A. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

SAUTTO, G. et al. Possible future monoclonal antibody (mAb)-based therapy against arbovirus infections. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

SILVA, F. G. et al. Avaliação de kits comerciais para deteção de antígenos NS1-dengue – São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 8, n. 91, p. 14-26, 2011.

SILVA, A. M. **Caracterização molecular dos vírus dengue circulantes em Pernambuco: implicações epidemiológicas.** 2013. Tese de Doutorado. Recife: Fundação Oswaldo Cruz.

SILVA, V. L. et al., **Manual laboratorial da dengue no estado de Goiás.** 2014.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 2, p. S22-S35, 2007.

SIQUEIRA JR, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 48, 2005.

SHENG, Y.; MANCINO, V.; BIRREN, B. Transformation of Escherichia coli with large DNA molecules by electroporation. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 11, p. 1990-1996, 1995.

SHIZUYA, H. et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 18, p. 8794-8797, 1992.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

TORRES, J. R.; CASTRO, J. The health and economic impact of dengue in Latin America. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. S23-S31, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. & CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TWIDDY, S. S.; HOLMES, E. C.; RAMBAUT, A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Molecular biology and evolution*, v. 20, n. 1, p. 122-129, 2003.

UJVARI, S. C. The history of the dissemination of microorganisms. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 171-182, 2008.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 2-9, 2000.

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.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000.

WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *Journal of virology*, v. 74, n. 7, p. 3227-3234, 2000.