



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Expressão de proteínas do vírus da Dengue em células de inseto utilizando o Sistema Baculovírus de Expressão

Maria Creuza do Espírito Santo Barros

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Co-Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília, 15 de fevereiro de 2007

ÍNDICE

Figuras	vi
Citações	viii
Dedicatória	ix
Agradecimentos	x
Resumo	xiii
Abstract.....	xv
1. Introdução.....	17
1.1. Dengue.....	17
1.2. <i>Dengue virus</i>	21
1.3. Dengue Hemorrágica.....	25
1.4. Diagnóstico.....	26
1.4.1. Isolamento viral	27
1.4.2. Métodos sorológicos.....	29
1.5. Uso de proteínas recombinantes no diagnóstico de Dengue	30
1.6. Expressão de proteínas recombinantes <i>in vitro</i>	32
1.6.1. Sistema de expressão procariótico: <i>E. coli</i>	32
1.6.2. Sistemas de expressão eucarióticos	33
1.6.2.1. Leveduras.....	33
1.6.2.2. Adenovírus em célula de mamífero.....	34
1.6.2.3. Células de mamífero e células de inseto.....	34
1.7. Baculovirus.....	36
1.8. Classificação dos Baculovírus.....	36
1.9. Estrutura do vírion.....	37
1.10. Modo de infecção <i>in vivo</i>	39

1.11. Modo de infecção <i>in vitro</i> : infecção de cultura de células de inseto.....	40
1.12. Fases da infecção viral: regulação da expressão gênica.....	43
1.13. Sistema de Expressão Baculovírus.....	44
2. Objetivos.....	47
2.1. Estratégias.....	47
3. Material e Métodos.....	48
3.1. Obtenção dos genes do Envelope e NS1.....	48
3.2. Clonagem e seqüenciamento de Env, NS1 e EnvNS1.....	52
3.3. Construção dos vetores pFastDE e pFastDENS1.....	55
3.4. Construção dos bacmídeos recombinantes BacDE e BacDENS1.....	57
3.5. Obtenção dos baculovirus recombinantes.....	59
3.6. Análise transcricional (RT-PCR).....	60
3.7. Análise da expressão da proteína ENV e da proteína ENVNS1 em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) e Imuno-deteccção.....	62
3.8. Construção de célula estável (DNS1).....	64
3.9. Ensaio de fusão.....	67
4. Resultados.....	68
4.1. Obtenção dos genes Env, NS1 e EnvNS1.....	68
4.2. Clonagem e seqüenciamento de Env, NS1 e EnvNS1.....	68
4.3. Obtenção dos vetores pFastDE e pFastDENS1.....	71
4.4. Obtenção dos bacmídeos recombinantes BacDE e BacDENS1.....	77
4.5. Análise transcricional do genes Env e EnvNS1 expressos em células de inseto.....	80
4.6. Análise da expressão da proteína ENV e da proteína ENVNS1 em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) e Imuno-deteccção (Western-blot).....	83

4.7. Construção do vetor de célula estável contendo o gene NS1	86
4.8. Ensaio de fusão	87
5. Discussão	89
6. Conclusões e perspectivas	97
7. Referências bibliográficas	98

FIGURAS

Figura 1: Ilustração das diferentes fases de desenvolvimento e foto do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura 2: Divisão da Família <i>Flaviviridae</i> em gêneros e organização genômica dos <i>Flavivirus</i>	22
Figura 3: Partícula viral imatura e madura de <i>Dengue virus</i>	24
Figura 4: Efeitos citopáticos do vírus da dengue em cultura de células de inseto	28
Figura 5: Estrutura do baculovírus	38
Figura 6: Desenho esquemático: o ciclo de infecção por baculovírus in vivo	42
Figura 7: Plasmídeo pGEM-T Easy (Promega).....	53
Figura 8: Plasmídeo pFastBac1 (Invitrogen).....	55
Figura 9: Sistema Bac-to-Bac de expressão.	57
Figura 10: Plasmídeo pGEM-T (Promega).	65
Figura 11: Plasmídeo pBS IE1 Gpac.....	66
Figura 12: Obtenção dos genes do envelope, NS1 e Envelope e NS1 juntos.	69
Figura 13: Plasmídeos DE , DNS1 e DENS1.....	70
Figura 14.: Sequência gênica da região dos genes do envelope e NS1 do vírus da dengue sorotipo 1 isolado no Distrito Federal.....	75
Figura 15: Clonagem do gene do envelope no plasmídeo pFastBac1.....	76
Figura 16: Clonagem do gene do EnvNS1 no plasmídeo pFastBac1	78
Figura 17: Confirmação da transposição dos genes de interesse para o bacmídeo.	79
Figura 18: Análise transcricional de células TN5B infectadas com vAcDE.....	81
Figura 19: Análise transcricional de células TN5B infectadas com vAcDENS1.	82

Figura 20: SDS PAGE e Imuno-marcação de vAcDE em células do tecido adiposo de <i>Spodoptera frugiperda</i>	84
Figura 21: SDS PAGE e Imuno-marcação de vAcDENS1 em células do tecido adiposo de <i>Spodoptera frugiperda</i>	85
Figura 22: Confirmação da clonagem de NS1 em pGEM HSP 70	86
Figura 23: Ensaio de fusão de membrana.	88

“Se queres viver em paz

Segue os princípios do bem.
Atende o próprio caminho,
Não penses mal de ninguém.
Ama a tarefa que tens
E o dever que ela te aponta;
Sobre os problemas dos outros,
Não formam em nossa conta.
Não guardes idéias tristes
Entre as lembranças que levas,
O sol atravessa a noite
Sem alterar-se nas trevas.
Se alguém te ofende, perdoa,
Seja na rua ou no lar,
Todos nós, perante a vida,
Somos capazes de errar.
Quanto ao mais, confia em Deus
E anota esta lei segura:
Cada pessoa se vira
Sob aquilo que procura.”

(Jair Presente)

À todas as pessoas que lutam pelos seus sonhos e que sabem que, mesmo quando eles
dão trabalho, no fim valem muito a pena. ☺

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por tudo que tive a oportunidade de aprender até hoje, por todas as pessoas maravilhosas com quem pude conviver e por dar-me sempre força para lutar por tudo aquilo em que acredito.

Ao meu orientador Dr. Bergmann Morais Ribeiro, por saber de verdade o que é ser um orientador: por saber respeitar as escolhas de seus alunos nunca ficando a parte de seu crescimento, mantendo-se sempre presente na sua função de educador. Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar com aquilo que sempre sonhei, muito obrigada por ser realmente um Professor, alguém sempre disposto a ensinar, a passar seus conhecimentos adiante de forma admirável e acessível, por ser realmente um exemplo de profissional a ser seguido. Ah! Muito obrigada por manter um laboratório onde as pessoas são muito mais que colegas, com um ambiente tão bom e amigável.

Ao meu co-orientador Dr Tatsuya Nagata por todas as vezes que se propôs a me ajudar durante esse trabalho. Muito obrigada não só pelos materiais ou procedimentos que tive a oportunidade de aprender com o Sr, mas principalmente pela atenção, receptividade, pela paciência e dedicação.

Ao Professor Antônio de Jesus Melo Chaib, por ter aberto as portas que permitiram que eu chegasse até aqui. Muito obrigada pelo carinho e pela atenção, pelas dicas e conselhos e principalmente pelo incentivo.

Aos professores do laboratório de Microscopia Eletrônica, Dr Renato Resende e Dra Sônia Bão, pela ajuda sempre que necessária, pelo carinho e receptividade.

Aos meus pais, Odemar e Katinha, por serem meu porto seguro, meu guia, meus amigos, por serem as pessoas que eu procuro me espelhar para enfrentar o mundo. Muito obrigada por terem sempre me ensinado o que é amor, respeito e dignidade,

muito obrigada por serem as pessoas maravilhosas que vocês são. Muito obrigada por tudo, tudo, tudo.

Aos meus avós, Vovó Katy e Vovô Valério, por serem essas pessoas lindas que sei que posso contar a qualquer momento, por sua doçura, carinho, sensibilidade. Obrigada pelo apoio incondicional.

A toda minha família linda, tios, tias, primos e primas, pela união, pelos bons momentos juntos, pelo apoio e incentivo não só ao meu trabalho mas em todas as ocasiões da minha vida. Amo vocês!

À querida Tatiane Guerreiro Campanhoni Machado, Verdinha, obrigada por tudo: pelo guia do estudante, pela maneira precisa de trabalhar, pela força e pelo carinho. Não tenho palavras pra agradecer tudo que você fez e tem feito por mim, sem você este sonho não seria realidade (e também não seria tão divertido!). Obrigada por ser exatamente do jeito que você é e por ter me ensinado muita coisa que levarei por resto da minha vida.

As minhas queridas Susane, Carol e Sara, por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida, bons e ruins, e por serem essas pessoas maravilhosas que são raras de se encontrar, sempre lutando pela luz. Obrigada pelo carinho, pelos conselhos, puxões de orelha e ótimos momentos juntos!

À minha querida amiga Amanda pelo longos anos de amizade. Obrigada por saber que mesmo quando estamos longe podemos contar uma com a outra. Obrigada pelo carinho, pelas risadas, pelo apoio e incentivo.

Ao meu querido Claudinho, por ser sinônimo de paz quando tudo parece um caos. Por ser essa pessoa serena e centrada mas, ao mesmo tempo, luz e cor na minha vida. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa que me faz tão bem.

Aos amigos do laboratório, não dá para esquecer!!! Muito obrigada pelos dias maravilhosos que podemos passar juntos, pelo clima amigável que podemos encontrar em nosso laboratório sendo isso tão raro em outros locais. Agradecimentos especiais a Susane Susi Susi, Nayara Naná, Aline line, Anabele Bele, Glaucinha, Juju, Greice Greice, Érica, Sandroca, Malu e Arthur, Marcelo celo, Bruno, Thiago, Roberto, Breno, Paulo, Ramon, Raimundo, Pinedo, Hugo, Ana Paula, Davi, Claudinha, Virgínia, Vítor, Shélida, muito obrigada por serem essas pessoas lindas que eu sei que posso contar, muito além do que apenas no âmbito profissional. Gostaria de agradecer um por um, por tudo de especial que vocês trouxeram para a minha vida, tenham a certeza que vocês são inesquecíveis. Desculpem-me se eu esqueci alguém aqui, tenha a certeza de que foi somente pela correria!

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de realização do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

RESUMO

A Dengue é a doença humana transmitida por mosquitos mais comum que pode evoluir para uma doença potencialmente letal denominada de febre hemorrágica do dengue (FHD). Essa doença é causada por um vírus de RNA fita simples, senso positivo e envelopado que pertence ao gênero *Flavivirus*, onde o genoma é organizado em uma única fase aberta de leitura (ORF), que codifica três proteínas estruturais (capsídeo, pré-M e envelope) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). Entre as proteínas virais, a proteína do envelope é uma das mais antigênicas e a proteína NS1 está relacionada com a lise de células infectadas, mediada pelo sistema complemento. Diferentes sistemas de expressão podem ser usados para a expressão de antígenos virais para o desenvolvimento de vacinas e/ou diagnóstico. Entre estes sistemas, o sistema de expressão baseado em baculovírus (BEV) é um dos mais populares e eficientes. Baculovírus infectam artrópodes, principalmente insetos e possuem um genoma de DNA circular, dupla fita. Existem muitas vantagens do BEV em relação a outros sistemas de expressão, como, por exemplo, o alto nível de expressão e as modificações pós-traducionais que permitem a montagem correta e atividade biológica da proteína expressa. Um isolado brasileiro de *Dengue virus 1* foi usado para amplificar o gene do envelope ou o gene do envelope fusionado ao gene NS1 por RT-PCR, usando oligonucleotídeos específicos e os fragmentos obtidos foram clonados no vetor de transferência comercial pFastBac1 (Invitrogen). Esse plasmídeo possui regiões sítio-específicas que permitam a transposição do inserto de interesse dentro do genoma de um baculovírus (bacmídeo) propagado em *Escherichia coli*. O bacmídeo recombinante é usado para a expressão da proteína heteróloga em células de inseto infectadas. Dois vírus recombinantes foram obtidos, vAcDE e vAcDENS1, que

foram, então, usados para infectar larvas de *Spodoptera frugiperda*. Extratos de tecido adiposo de larvas infectadas (96 h.p.i.) foram analisadas por SDS-PAGE e Western-blot, usando um anticorpo contra o vírus do dengue, que detectou um polipeptídeo por volta de 70 kDa em ambos os extratos. Esse polipeptídeo é diferente do tamanho predito da proteína do envelope (~50 kDa) e das proteínas do envelope mais NS1 fusionadas (~90kDa). Entretanto, a análise transcricional confirmou que os genes estavam sendo transcritos em células infectadas. Nós também usamos o vírus vAcDENS1 em um ensaio de fusão de membrana e confirmamos a formação de sincício dependente de pH, o que é uma característica da proteína do envelope do vírus do dengue. O gene NS1 foi também clonado em um plasmídeo, sob o comando do promotor hsp70 de *Drosophila melanogaster* e usado em uma co-transfecção com um plasmídeo contendo um gene de resistência à puromicina, visando a construção de células de inseto estavelmente transformadas.

ABSTRACT

Dengue is the most common mosquito-borne viral disease of humans and its infection may evolve to a potentially lethal disease known as Dengue haemorrhagic fever (DHF). This disease is caused by a positive-sense, single-stranded, enveloped RNA virus that belongs to the genus *Flavivirus* within *Flaviviridae* and its genome is organized in a single ORF which encodes three structural proteins (capsid, pre-M, and envelope) and seven non-structural proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). Among the viral proteins, the envelope protein is one of the most antigenic and NS1 play a possible role in complement-mediated cytolysis. Different heterologous expression systems may be used for the expression of viral antigens for vaccine and/or diagnosis development. Among these, the Baculovirus Expression System (BEV) is one of the most popular and efficient system. Baculoviruses have a circular, double stranded DNA genome and infect arthropodes, mainly insects. There are many advantages of using BEV, when compared to other expression systems, such as high expression levels and post-translational modifications that allows the expressed proteins to be correctly folded and biologically active. A Brazilian Dengue 1 isolate was used to amplify the envelope gene alone or envelope plus NS1 gene by RT-PCR using specific oligonucleotides and cloned into the commercial transfer vector pFastBac1 (Invitrogen). This plasmid has site-specific regions which allows transposition of the chosen insert into a baculovirus genome (bacmid) propagated in *Escherichia coli*. The recombinant bacmid DNA is used to obtain recombinant baculovirus and heterologous protein expression in virus-infected insect cells. Two different recombinant virus were obtained, vAcDE and vAcDENS1, and they were used to infect *Spodoptera frugiperda* larvae. Fat body extracts of infected larvae (96 h p.i.) were analysed by SDS-PAGE and Western

blot using an anti-Dengue antibody which detected a polypeptide around 70 kDa in both extracts. The size of this polypeptide is different from the predicted size of the envelope protein (~50 kDa) and the fused envelope and NS1 proteins (~90kDa). However, transcriptional analysis confirmed that the genes were being transcribed in infected cells. We also used the vAcDENS1 virus in a membrane fusion assay and confirmed pH-dependent syncytium formation, which is a characteristic of the dengue virus envelope protein.. The NS1 gene alone was cloned under the control of hsp70 promoter and used to co-transfect insect cells with a plasmid containing the puromycin resistance gene, in order to produce stably transformed insect cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue

A Dengue é a doença viral transmitida por vetor mais disseminada entre humanos. A Organização Mundial da Saúde estima que 50-100 milhões de casos de Dengue ocorrem anualmente em todo o mundo e que cerca de 500.000 casos evoluem para formas mais graves da doença como a dengue hemorrágica e a síndrome do choque (Stephenson, 2005). Os primeiros relatos de Dengue datam de 1779/1780 e diversas tentativas de erradicação já foram tentadas. Entretanto, a doença ainda é endêmica em muitas regiões do mundo, especialmente nos países tropicais e subtropicais. A incidência de casos de Dengue tem aumentado bastante nas Américas, mas os casos fatais tem sido mais comuns no sudeste da Ásia e no oeste do Pacífico. Isso pode estar relacionado tanto com o crescimento da urbanização não planejada, resultando em grande impacto ambiental, quanto à deterioração dos sistemas de saúde e facilidade de disseminação de genótipos virais mais virulentos em indivíduos mais susceptíveis (Guzmán & Kourí, 2001).

Nas regiões tropicais e subtropicais, a Dengue coloca em risco a saúde de 2,5 bilhões de pessoas, aproximadamente 40% da população mundial. Por se tratarem muitas vezes de países subdesenvolvidos, o combate à dengue nem sempre recebe a devida atenção por escassez de recursos e hoje representa 10% das causas mais comuns de hospitalização, além de constar como causa líder de mortalidade infantil em alguns países asiáticos. Nas Américas, o número de casos de Dengue que evoluem para complicações mais graves vem crescendo desde 1980 e o Brasil figura como o país líder no número absoluto de casos. Já a

Colômbia aparece como o país com as mais altas taxas de casos de dengue hemorrágica e da síndrome do choque (Fonseca & Fonseca, 2002).

Muito da distribuição mundial dos casos de Dengue se deve à densidade e distribuição geográfica de mosquitos vetores pertencentes ao gênero *Aedes* e, por ser uma doença transmitida por vetor artrópode, a Dengue também pode ser classificada como uma arbovirose (“arbo” do inglês “arthropod borne”). A doença é transmitida por fêmeas de mosquitos pertencentes a esse gênero, sendo a espécie *Aedes aegypti* (Figura 1) a mais prevalente nas Américas (Fonseca & Fonseca, 2002). Outras arboviroses estão relacionadas com a distribuição desse vetor, dentre as mais importantes está a Febre Amarela no seu ciclo urbano (Vasconcelos, 2003). A primeira suposta erradicação do mosquito ocorreu em 1956 pelo uso do inseticida DDT na campanha da organização de saúde pan-americana (PAHO) nas Américas com o objetivo de assegurar a erradicação da febre amarela urbana, ocorrida em 1942, através da vacinação. Desde então, o mosquito reemergiu em várias ocasiões e sua erradicação ainda hoje é motivo para campanhas junto à população. O mosquito *Aedes albopictus* também está relacionado à transmissão da Dengue, mostrando-se mais eficiente do que o *Aedes aegypti* apesar de não competir com este em ambientes urbanos. É bastante freqüente na Ásia, em áreas rurais (Marzochi, 1994).

Uma vez que uma pessoa é picada por um mosquito infectado, ocorre um período de incubação que pode variar de 3 a 14 dias, sendo mais comum que dure uma semana. Esse período é assintomático e precede os primeiros episódios de febre comuns à doença. (Gubler, 1998). O período de viremia, ou seja, o período no qual o vírus pode ser isolado do sangue circulante, começa cerca de 2 dias antes dos sintomas até 5-6 dias depois, quando ocorre um clearance viral (ou seja, a eliminação do agente viral) da circulação e o aparecimento de anticorpos neutralizantes (Fonseca & Fonseca, 2002). O período de

viremia torna o indivíduo infectado potencialmente infectante se este for picado por outro mosquito vetor ocorrendo assim, a disseminação da doença.

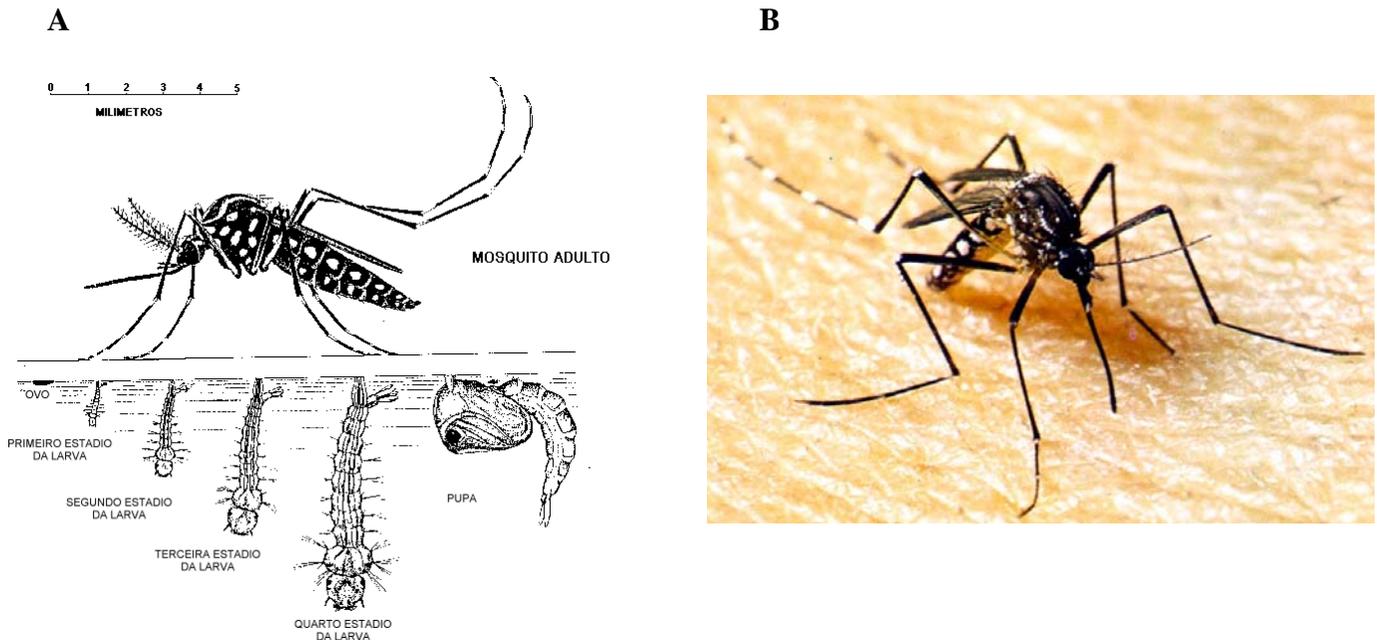


Figura 1: a) Ilustração mostrando as diferentes fases de desenvolvimento (ovo a adulto) do mosquito *Aedes aegypti* e b) foto de um mosquito da espécie *Aedes aegypti* Adaptado de <http://www.prdu.unicamp.br/dengue/mosquito.html>

A manifestação clínica que segue o período de incubação é bastante variável e pode corresponder aos sintomas de uma gripe, apresentar sintomas da Dengue clássica ou evoluir para um quadro mais grave de hemorragia e choque. Existem relatos ainda de infecção assintomática, mais freqüente em crianças (Stephenson, 2005). Os sintomas de Dengue clássica começam com febre alta acompanhada de fortes dores de cabeça, mialgia (dores musculares), calafrios e dor retro-orbital (dor atrás dos olhos). Após 2-6 dias de febre, o paciente começa a apresentar anorexia, náusea e vômito além de dores

generalizadas, por todo o corpo (Henchal & Putnak, 1990). Após esse período, a maioria dos casos evolui para a cura, por volta do 7º dia, com um último acesso de febre alta. Entretanto, o período de recuperação e cura é associado com fadiga prolongada e depressão (Fonseca & Fonseca, 2002).

Manifestações hemorrágicas durante a manifestação clínica de Dengue clássica não são incomuns e podem variar de formas moderadas a severas. Formação de petéquias (hemorragias minúsculas, de 1 a 2 mm de diâmetro) e púrpura (hemorragias de até 1 cm, podendo ser reunião de várias petéquias) na pele, sangramento gengival e epistaxe (sangramento nasal) são descritos e podem ser os primeiros sintomas a indicar a condição de dengue hemorrágica mas não a definem se não houver descrição de trombocitopenia (redução do número de plaquetas no sangue) e hipovolemia (diminuição da quantidade de sangue circulante) (Gubler, 1998). A dengue hemorrágica começa com sintomas indistinguíveis da dengue clássica (que apesar de bastante incapacitante apresenta prognóstico favorável) e a deterioração, que pode culminar com o óbito do paciente, ocorre de maneira rápida. A Organização Mundial da Saúde estabeleceu critérios para classificar a severidade da doença: Os níveis I e II correspondem aos casos de sintomas moderados enquanto que os níveis III e IV correspondem a casos de sintomas severos. As características avaliadas nessa classificação são: permeabilidade capilar aumentada, alteração numérica e funcional dos leucócitos, hematócrito aumentado e trombocitopenia, sendo a presença de choque, a diferença principal entre os níveis III e IV de classificação (Guzmán & Kourí, 2001).

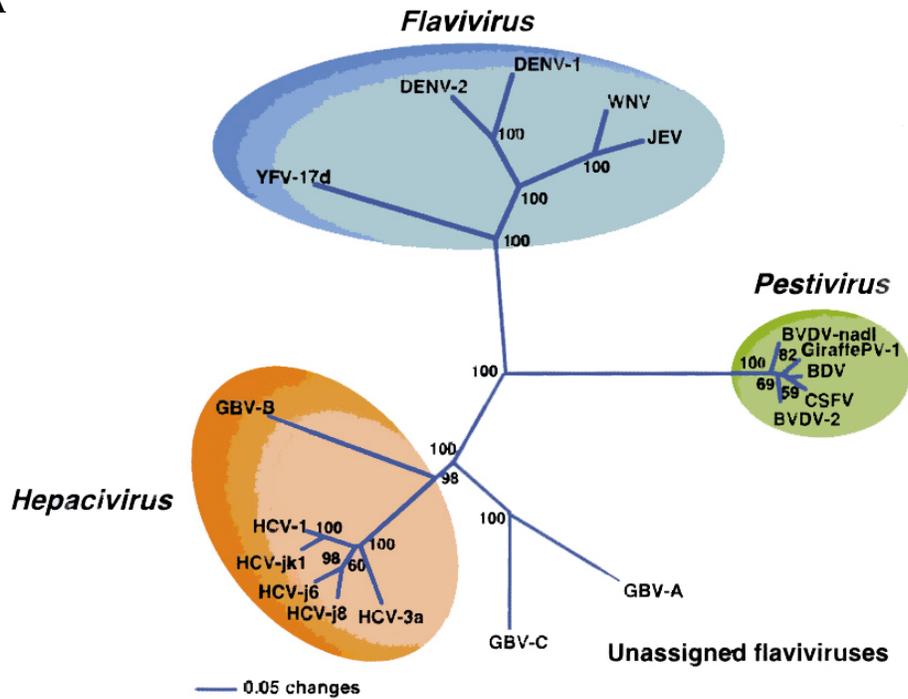
1.2. *Dengue virus*

O agente etiológico da Dengue é o *Dengue virus*, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. A família *Flaviviridae* compreende 3 gêneros distintos: *Flavivirus* (gênero ao qual também pertence o vírus da Febre Amarela e uma série de encefalites transmitidas por artrópodes), *Pestivirus* (vírus de suínos e ruminantes) e *Hepacivirus* (vírus da Hepatite C em humanos). Os gêneros são antigenicamente distintos entre si, mas bastante semelhantes quanto a sua organização genômica, sendo compostos de RNA fita simples sentido positivo que codifica uma única fase aberta de leitura (ORF, do inglês: "open reading frame"). As proteínas virais são sintetizadas como uma poliproteína que é clivada co-traducionalmente e pós-traducionalmente por proteases celulares e virais (Fauquet *et alli.*, 2005). (Figura 2)

O vírus da Dengue é um vírus envelopado que possui como material genético uma fita de RNA sentido positivo que possui cap na região 5' mas não apresenta cauda poli-A na região 3' (Henchal & Putnak, 1990). Seu genoma consiste de 10.644 nucleotídeos organizados em uma única fase de leitura aberta que codificam uma única poliproteína de 3.386 aminoácidos flanqueada por duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR – do inglês: "untranslated regions") (Zhang *et alli.*, 1988). A poliproteína é processada para formação de 3 proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (pré-M) e envelope (E); e 7 proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5. (Kelly *et alli.*, 2000).

A partícula viral madura apresenta as 3 proteínas estruturais juntamente com uma bicamada lipídica empacotando o genoma de RNA viral. A proteína C, do nucleocapsídeo,

A



B

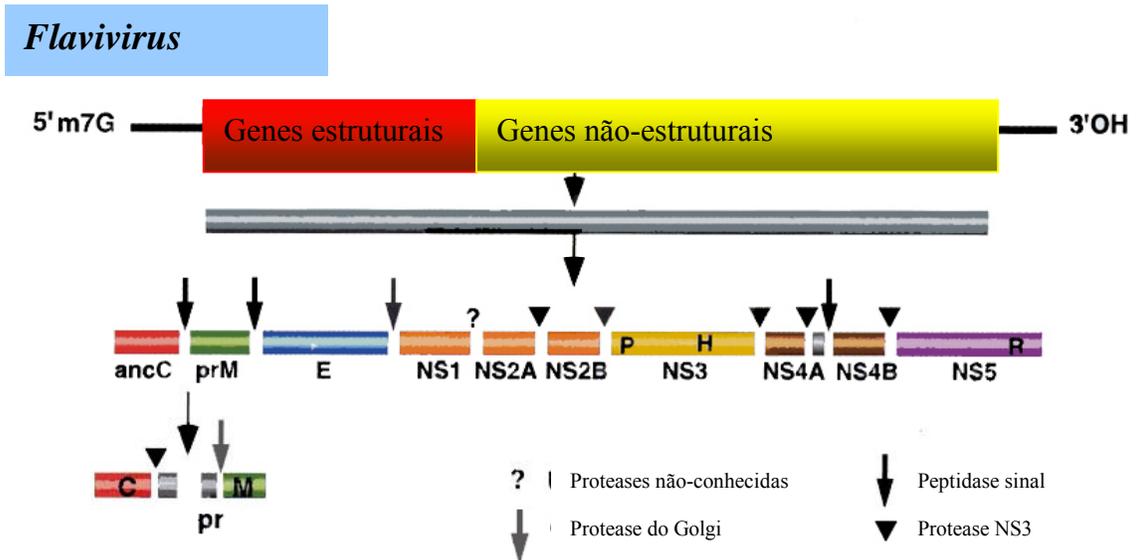


Figura 2: a) Árvore Filogenética da família *Flaviviridae*: divisão em gêneros; b) Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*. Adaptado de Van Regenmortel *et alli.*, 2000.

forma uma estrutura tênue que envolve o RNA, mas que é permeável a RNases, o que torna o papel de proteção do envelope lipídico mais importante. A proteína E e a proteína pré-M encontram-se imersas na bicamada lipídica (Henchal & Putnak, 1990).

Assim como acontece com os vírus da influenza e os alphavirus, os flavivirus entram na célula por endocitose mediada por receptor. O ambiente acidofílico do endossomo é responsável por desencadear uma mudança conformacional nas glicoproteínas de fusão (Rey, 2003). Neste caso, a mudança ocorre na glicoproteína do envelope (E) que é a responsável tanto pela ligação ao receptor quanto pelo processo de fusão com a membrana celular do endossomo e liberação dos componentes virais no citoplasma celular. Assim sendo, a correta organização do envelope viral é essencial durante as fases de adsorção e penetração (Henchal & Putnak, 1990). Esta bicamada lipídica é obtida por brotamento no retículo endoplasmático celular e possui em sua composição a proteína do envelope (E) e a proteína precursora da membrana (pré-M). A partícula passa pela via secretória e pré-M é clivada por uma furino-protease e passa a assumir a sua forma madura constituindo a proteína de Membrana (M). A clivagem permite que as partes da proteína E que se projetam do vírus fiquem mais evidentes e a saída do vírus ocorre por exocitose (Modis *et alli.*, 2003). A clivagem de pré-M em M é fundamental para a infectividade do vírus, pois partículas imaturas não são capazes de promover a fusão do vírus com membranas celulares, inclusive com a do endossomo. Entretanto, a maturação da partícula a torna mais lábil e menos resistente sendo a partícula imatura inerte mais estável (Henchal & Putnak, 1990).(Figura 3)

A patogênese do vírus da Dengue ainda não é conhecida por completo e muito disso se deve ao fato de que não existe ainda um modelo animal ou laboratorial estabelecido para o estudo dessa doença. O desenvolvimento da doença é multifatorial e

envolve tanto o modo de infecção viral e suas variações até a reação do indivíduo hospedeiro e a resposta do seu sistema imunológico à infecção. Estudos filogenéticos e epidemiológicos sugerem que vírus contendo algumas seqüências genômicas específicas, que caracterizam os vírus em genótipos distintos, apresentam maior virulência e acabam por influenciar na evolução da doença para a dengue hemorrágica. Os genótipos mais virulentos são de vírus oriundos do sudeste da Ásia que produzem viremias com títulos virais maiores e são capazes de infectar mais mosquitos vetores. Essa classificação em genótipos é relativamente nova, já que a variabilidade do vírus era antes descrita apenas por sorotipos, referentes aos anticorpos neutralizantes produzidos na fase pós-virêmica (Cologna *et alli.*, 2005).

Morfologia

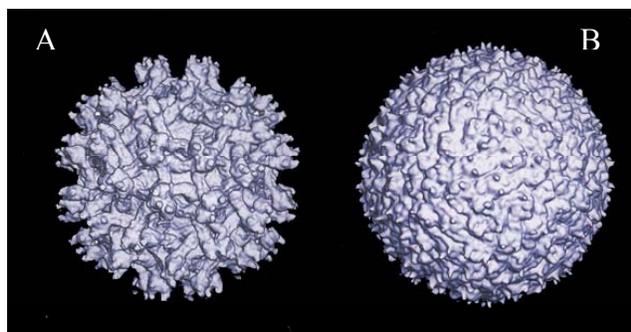
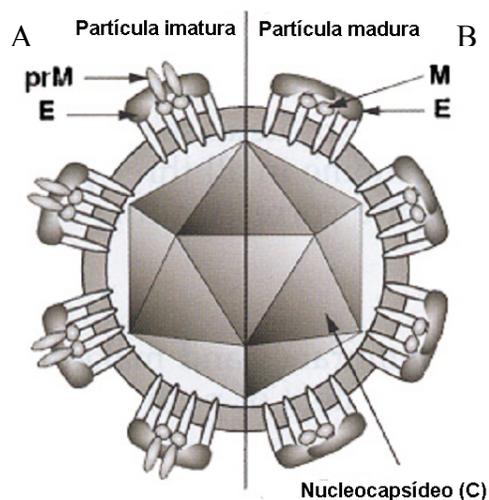


Figura 3: Esquema da partícula viral imatura (A) e madura (B) do *Dengue virus*. A figura da direita corresponde à uma reconstrução de microscopia eletrônica de congelamento das partículas de um isolado de Dengue vírus. Adaptado de Van Regenmortel *et alli.*, 2000.

Os quatro sorotipos do vírus da Dengue começaram a ser descritos a partir de 1943 quando vários pesquisadores passaram utilizar camundongos recém-nascidos para amplificar o vírus por inoculação intracerebral (Henchal & Putnak, 1990). Considerando a dificuldade do vírus da dengue de se estabelecer *in vitro* os anticorpos de pacientes serviram de base para uma classificação em sorotipos, que são distinguidos por anticorpos neutralizantes produzidos pelo organismo em resposta à infecção, especialmente reagindo contra a proteína E e as proteínas não-estruturais NS1 e NS3 (Stephenson, 2005). A produção de anticorpos anti-E inibe a ligação do vírus à célula e a produção de anticorpos anti-NS1 promove ativação do sistema complemento e conseqüente lise da célula infectada (Chaturvedi *et alli.*, 2005). A infecção por um sorotipo de dengue torna o indivíduo imune a este sorotipo, mas este continua susceptível aos outros sorotipos virais. Quando ocorre uma infecção subsequente com um segundo sorotipo, o indivíduo se torna mais susceptível ao desenvolvimento de Dengue hemorrágica, o que tem se tornado um empecilho bastante grave, principalmente na confecção de uma vacina contra a Dengue (Leitmeyer *et alli.*, 1999).

1.3. Dengue Hemorrágica

A teoria hoje mais aceita sobre a evolução da Dengue para Dengue hemorrágica é a “antibody enhancement hypothesis”, que traduzindo seria uma hipótese em que os anticorpos não-neutralizantes da fase pós-virêmica poderiam estar relacionados ao aumento da infectividade de um segundo sorotipo viral em uma segunda infecção por Dengue. Assim, diferente do que ocorre em outras infecções virais, os anticorpos produzidos na

primeira infecção ajudariam o vírus e não o hospedeiro em uma segunda infecção. Anticorpos não-neutralizantes produzidos durante a primeira infecção se ligariam aos novos vírus infectantes facilitando sua entrada em algumas células. Esse complexo antígeno-anticorpo se ligaria à receptores de imunoglobulinas G presentes na superfície das células permissivas, em especial células da linhagem mononuclear fagocítica, promovendo a internalização deste complexo (Stephenson, 2005). Os macrófagos são descritos como as células mais envolvidas nesse processo e correspondem à peça chave no arranjo da resposta imunológica à infecção. Após a internalização do complexo o caminho normal seria que alguns epítomos fossem apresentados a outras células do sistema imunológico através de moléculas de MHCII, mas o vírus da Dengue começa a se replicar dentro dos macrófagos comprometendo toda a resposta imunológica do indivíduo (Chaturvedi *et alli.*, 2006).

A infecção dos macrófagos pode agir na dengue hemorrágica induzindo linfócitos T CD4 (linfócitos auxiliares) a produzir citocinas específicas, como por exemplo a hCF, uma citocina com função de fator citotóxico que é produzida apenas na infecção por Dengue que ocorre em humanos (hCF do inglês “human Citotoxic Factor”), que atuam como mediadoras de uma reação em cadeia que culmina no aumento da permeabilidade capilar e ocorrência de hemorragia (Chaturvedi *et alli.*, 2000). Além disso, a dengue hemorrágica também pode estar associada ao mimetismo molecular que existe entre 20 aminoácidos da proteína do Envelope do vírus da Dengue e o plasminogênio. Assim, anticorpos anti-E poderiam estar se ligando erroneamente a esta proteína, impedindo sua transformação em plasmina, uma proteína bastante importante na manutenção da hemostasia, na inibição da ocorrência de hemorragias (Fonseca & Fonseca, 2002).

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico definitivo de Dengue é laboratorial, uma vez que os sintomas clínicos podem ser confundidos facilmente com os de várias outras doenças. A detecção da infecção pode ser feita pelo isolamento viral, por detecção de anticorpos específicos da fase pós-virêmica ou ainda por detecção de antígenos virais ou RNA viral em soro ou tecidos, uma abordagem molecular mais recente. Cada teste possui suas limitações e alguns se encontram mais adaptados à rotina laboratorial de diagnóstico (De Paula & Fonseca, 2004).

1.4.1. Isolamento viral

Quatro métodos de isolamento viral são descritos e utilizam amostras de pacientes que possam conter o vírus ainda ativo: Infecção intracerebral de camundongos recém-nascidos, infecção de culturas de células de mamíferos, infecção intratorácica de mosquitos adultos e infecção de cultura de células de inseto. Cada método depende da disponibilidade e estrutura de cada laboratório e cabe levar em consideração, a dificuldade do vírus em se propagar *in vitro* devido à dificuldade de isolamento e o fato de que não existe um modelo animal estabelecido para Dengue (Samuel & Tyagi, 2006).

O método de inoculação intratorácica de mosquitos adultos é bastante sensível, mas apresenta complexidades intrínsecas à própria técnica além de lidar com o mosquito vetor da doença e apresentar um potencial risco de infecção e exigir uma estrutura com mecanismos rígidos de segurança. A inoculação intracerebral de camundongos recém-nascidos possui como vantagem a detecção do vírus mesmo que este esteja em pequena

quantidade, baixo título viral. Porém, exige que o laboratório possua estrutura de biotério além de ser uma técnica de alto custo e resultados demorados, é uma técnica de diagnóstico quase em desuso. O método de inoculação de culturas de células de mamíferos é bastante sensível, mas produz uma quantidade de vírus bastante pequena quando comparada ao método de inoculação do vírus em cultura de células de inseto, sendo o mais utilizado nos laboratórios atuais por sua sensibilidade, baixo custo e relativa facilidade de manuseio da técnica (Fonseca & Fonseca, 2002).

A identificação do vírus é feita pela observação de efeitos citopáticos nas células infectadas (Figura 4) que passam a apresentar formação de sincícios, presença de células gigantes multinucleadas. Esta modificação é comum durante a infecção por flavivirus, então o isolamento viral é confirmado pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo de Dengue (Guzmán & Kourí, 2001).

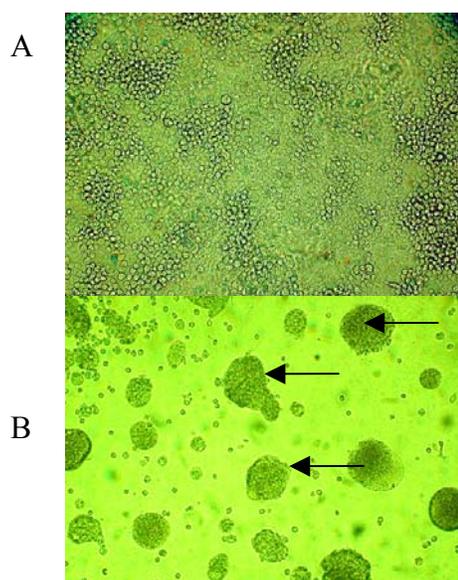


Figura 4: Efeitos citopáticos do vírus da dengue em cultura de células de inseto C6/36. A) Células não-infectadas; B) células infectadas com o vírus da Dengue. Foto gentilmente cedida pelos professores Antônio de Jesus Melo Chaib e José Marcus Teixeira (LACEN-DF). Observar a formação de sincícios (setas).

1.4.2. Métodos sorológicos

Os métodos sorológicos só podem ser utilizados cerca de 5 dias após o desenvolvimento da doença, o que acaba sendo bastante comum na rotina laboratorial por ser quando o indivíduo geralmente procura ajuda médica. As limitações desse método incluem a reatividade cruzada que pode existir entre os diferentes sorotipos de Dengue e outros flavivirus. Os métodos sorológicos incluem o teste de inibição da hemaglutinação, fixação de complemento, teste de neutralização, ELISA (do inglês: "Enzyme linked immunosorbent assay") de imunoglobulina M e ELISA indireto de imunoglobulina G. (De Paula & Fonseca, 2004)

Os métodos de ELISA são os mais utilizados na rotina diagnóstica por serem bastante sensíveis e relativamente baratos quando comparados aos outros testes. Existem kits comerciais diversos para este tipo de detecção que avaliam a fase de infecção de acordo com a prevalência de alguns tipos de anticorpos. O MAC-ELISA anti-IgM é o mais utilizado para detecção de anticorpos da fase aguda e os anticorpos IgM apresentam títulos bem mais altos em uma infecção primária, proporcionando um diagnóstico bastante sensível e rápido (De Paula & Fonseca, 2004). Durante uma infecção secundária, os anticorpos IgG são mais comuns, são os anticorpos de memória, e aparecem em títulos bem mais altos do que os IgM, os quais podem nem ser detectados (Guzmán & Kourí, 2001).

Apesar de bastante sensível, o diagnóstico sorológico não identifica a variedade viral infectante, principalmente devido à presença de reações cruzadas entre diferentes sorotipos e outros flavivirus. As técnicas moleculares foram desenvolvidas para suprir esse tipo de necessidade e a técnica de RT-PCR (do inglês: "Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction"), por exemplo, é capaz de detectar vírus ligados a anticorpos

neutralizantes e tipar o vírus rapidamente. Além disso, essa técnica é capaz de detectar pequenas quantidades do vírus, seja por viremia baixa ou por má qualidade da amostra, por inadequação na estocagem e transporte, por exemplo (Fonseca & Fonseca, 2002). Além disso, o RT-PCR pode ser utilizado em uma gama de amostras bastante ampla, que vai de amostras clínicas, biópsias, amostras de autópsias e materiais de mosquitos (De Paula & Fonseca, 2004).

As técnicas moleculares são bastante úteis na classificação dos vírus da Dengue em sorotipos, principalmente no que diz respeito a alterações nas seqüências de proteínas antigênicas e imunogênicas. Os sorotipos Dengue 1 e Dengue 2 foram subdivididos em 5 genótipos cada, baseado na diferença das seqüências da proteína do Envelope e da Proteína NS1 (Rico-Hesse, 1990), enquanto que o sorotipo Dengue 3 foi classificado em 4 genótipos por variações em E e em M e Dengue 4 em 2 genótipos com variações na proteína E (Guzmán & Kourí, 2001).

1.5. Uso de proteínas recombinantes no diagnóstico de Dengue

Os diagnósticos sorológicos de Dengue necessitam de um pool (conjunto) de antígenos confiáveis que proporcionem a certeza de que a única variável do teste será a gama de anticorpos a serem testados. Na rotina laboratorial, o antígeno utilizado é o próprio vírus, mas institutos de pesquisa têm investido na elaboração de proteínas recombinantes antigênicas que possam ser utilizadas substituindo o uso viral, é o caso do Instituto Biomanguinhos da FIOCRUZ do Rio de Janeiro que também investe na pesquisa de antígenos para confecção de vacinas tetravalentes (Bonaldo *et alli.*, 2000)

Vários trabalhos sugerem que a proteína do Envelope de Dengue é a mais indicada como proteína de escolha por estar exposta na superfície viral, ser responsável pela interação com receptores celulares e representar o alvo principal dos anticorpos neutralizantes (Jaiswal *et alli.*, 2003). Trata-se de uma glicoproteína de superfície, a maior presente na estrutura do vírion. Sua organização tridimensional na forma de trímeros foi recentemente descrita e figura agora, juntamente com a primeira estrutura cristalizada de glicoproteína de flavivirus, a do vírus TBE (tick-borne encephalitis, um flavivirus transmitido por carrapato), como uma das glicoproteínas de flavivirus disponíveis no banco de dados de proteínas, Protein Data Bank (Rey, 2003). A arquitetura molecular dessa glicoproteína é essencial para a infecção viral e qualquer alteração conformacional altera a superfície do vírion por completo (Modis *et alli.*, 2003).

As seqüências nucleotídicas das proteínas não-estruturais têm sido estudadas detalhadamente, uma vez que variações nas seqüências de NS1 e NS3 tem sido associadas ao aumento de virulência de alguns genótipos (Leitmeyer *et alli.*, 1999). Além disso, anticorpos contra proteínas não-estruturais são mais comumente encontrados em casos secundários de infecção de dengue, o que pode estar relacionado com a complicação da doença em uma segunda infecção. A proteína NS1 tem ainda uma importância na patogênese, pois anticorpos anti-NS1 estão envolvidos na destruição de células infectadas pelo sistema complemento e podendo ser um importante mecanismo antiviral a ser estudado (Chaturvedi *et alli.*, 2005).

1.6. Expressão de proteínas recombinantes *in vitro*

Diferentes sistemas de expressão são hoje utilizados na tentativa de isolar proteínas recombinantes que correspondam ao potencial antigênico do vírus da Dengue *in vitro*. Além do interesse referente ao desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, muito dos esforços estão direcionados à confecção de uma vacina tetravalente, contra os quatro sorotipos de Dengue, que confira proteção ao indivíduo sem que haja evolução para Dengue hemorrágica pela interação dos quatro sorotipos virais (Chaturvedi *et alli.*, 2005).

1.6.1. Sistema de expressão procariótico: *E. coli*

Os sistemas de expressão variam de acordo com as vantagens e desvantagens associadas à sua estratégia e célula de escolha. Os sistemas procarióticos apresentam como principal vantagem, a relativa facilidade de manutenção de culturas bacterianas além da grande quantidade de proteína recombinante que pode ser produzida em pouco tempo. A bactéria *Escherichia coli* é bastante utilizada como sistema de expressão e na literatura está descrita a produção de proteínas estruturais como a do envelope (Sugrue *et alli.*, 1997a), proteínas estruturais (E) e não estruturais (NS1) fusionadas (Srivastava *et alli.*, 1995), e expressão de alguns domínios protéicos específicos intimamente ligados à função antigênica da proteína (Simmons *et alli.*, 1998; Jaiswal *et alli.*, 2004). A principal desvantagem seria a qualidade da proteína produzida e a sua funcionalidade, uma vez que a produção protéica bacteriana é bem mais simples que a de uma célula eucariótica e

glicoproteínas, em especial, necessitam de algumas modificações pós traducionais, como glicosilação (Benz & Schmidt, 2002).

1.6.2. Sistemas de expressão eucarióticos

1.6.2.1. Leveduras

Os sistemas eucarióticos são escolhidos com mais frequência na produção de proteínas recombinantes que se destinam ao uso clínico ou diagnóstico. Isso é devido à necessidade da proteína produzida ser o mais funcionalmente semelhante à que seria produzida *in vivo*. O sistema eucariótico mais simples é o que utiliza leveduras, em especial a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (metilotrófica pois é capaz de obter energia e carbono através da metabolização de metano, metanol, metilamina (Moat *et alli.*, 2002).

A proteína do envelope do vírus do dengue pode ser encontrada sendo expressa isolada (Sugrue *et alli.*, 1997b) ou fusionada ao antígeno de superfície da hepatite B, HBsAg, em *Pichia pastoris* que, além de conferir estabilidade à proteína de interesse, facilita a formação de VLPs (do inglês “Virus-like particles”) ou seja, estruturas semelhantes à partícula viral original e promove um nível de imunogenicidade maior à proteína a qual foi fusionado por gerar polímeros de alto peso molecular (Bisht *et alli.*, 2001, 2002). A principal vantagem é o baixo custo na utilização de leveduras, o que se assemelha aos sistemas de expressão procarióticos e modificações pós-traducionais mais semelhantes ao que acontece *in vivo*. Entretanto, o sistema apresenta algumas dificuldades associadas à expressão de proteínas do vírus da Dengue e proteólise intensa já foi descrita quando da expressão da proteína E (Sugrue *et alli.*, 1997a). O antígeno HBsAg pode agir

estabilizando a partícula e minimizando o efeito de proteólise (Bisht *et alli.*, 2001), mas pouco é conhecido sobre a expressão de proteínas de flavivirus em leveduras, em especial sobre glicoproteínas, uma vez que o uso de *Pichia pastoris* é recente e a levedura anteriormente utilizada, *Saccharomyces cerevisiae*, apresentava diversos problemas nas modificações pós traducionais das proteínas recombinantes (Grinna & Tschopp, 1989; Sugrue *et alli.*, 1997)

1.6.2.2. Adenovírus em células de mamífero

Proteínas recombinantes de Dengue também já foram expressas utilizando o vírus Adenovírus defectivo para a replicação (Jaiswal *et alli.*, 2003), mas, apesar de resultados favoráveis na funcionalidade das proteínas, o vetor de expressão é considerado com reservas, uma vez que representa risco para a saúde humana se conseguir se restabelecer como vírus infectante (Stephenson, 2005). Além disso, por se tratar de um vírus comum em humanos, podem ocorrer reações cruzadas entre os anticorpos produzidos contra ele e anticorpos voltados à proteína recombinante de interesse e isso é especialmente negativo na confecção de antígenos para confecção de uma vacina (Jaiswal *et alli.*, 2003).

1.6.2.3. Células de mamífero e células de inseto

Sistemas de expressão utilizando células hospedeiras de mamífero ou de inseto são os mais indicados com relação às modificações pós-traducionais da proteína recombinante, em especial quando se trata de uma glicoproteína. Apesar da grande vantagem das células de mamífero na simulação do que ocorre na infecção *in vivo* se trata

de uma técnica de alto custo e pouca produtividade (Chaturvedi *et alli.*, 2005). Células de inseto por outro lado representam um sistema mais barato e eficiente, pois quando comparado aos outros sistemas de expressão já descritos, apresentam como vantagem a grande quantidade de proteína recombinante que pode ser produzida levando em conta principalmente que se trata de um sistema eucariótico de expressão (Morton & Potter, 2000).

As células de inseto, entretanto, apresentam alguns padrões de modificações pós-traducionais que diferem do que acontece nas células de mamífero, em especial no que se refere ao padrão de glicosilação das proteínas. As proteínas recombinantes em geral apresentam um tamanho menor do que a proteína in natura quando avaliadas em SDS-PAGE e isso está relacionado a três fatores em especial: processamento proteolítico (ou seja, reconhecimento de regiões por proteases), reconhecimento de sítios de glicosilação e estrutura dos glicanos (Altmann *et alli.*, 1999). Diferentes estratégias são descritas na literatura para contornar essas dificuldades tendo como base conhecimentos recentes sobre o metabolismo bioquímico das células de inseto (Ailor & Betenbaugh, 1999). O problema com a sialização (nas células de inseto não ocorre a adição de ácido siálico pela falta de proteínas responsáveis pelo processo, sialo-transferases, naturalmente presentes em células de mamíferos) tem sido contornado com a construção de vetores que codificam transferases na fase inicial de produção protéica (Jarvis *et alli.*, 2001). A mesma estratégia pode ser utilizada para melhorar o processo de glicosilação, mais especificamente o processo de N-glicosilação, com a utilização de glicosiltransferases de células de mamífero (Jarvis *et alli.*, 1998).

1.7. Baculovírus

Na expressão de proteínas recombinantes em células de inseto, o vetor mais utilizado é sem dúvida o Baculovírus, vírus que infectam hospedeiros artrópodes, especialmente patogênicos a insetos, pertencentes à família *Baculoviridae*. Inicialmente o baculovirus foi estudado e bastante utilizado como controle biológico de insetos-praga associados à agricultura (Castro *et alli.*, 1999). Sua utilização como ferramenta biotecnológica foi estabelecida na década de 80 (Smith *et alli.*, 1983a) e desde então vem sendo utilizada de maneira intensa, promovendo a expressão de proteínas oriundas de diferentes organismos (O'Reilly *et alli.*, 1992) podendo inclusive ser candidatos a vetores de terapia gênica por serem capazes de promover infecção e incapazes de se replicar em células de mamífero (Tani *et alli.*, 2003).

1.8. Classificação dos Baculovirus

Taxonomicamente os baculovirus são agrupados na família *Baculoviridae* que possui dois gêneros distintos: os NPV ou *Nucleopolyhedrovirus* e os GV ou *Granulovirus* (Murphy *et alli.*, 1995; Van Regenmortel *et alli.*, 2000). Nos baculovirus os vírions encontram-se oclusos em uma proteína cristal, denominada corpo de oclusão ou OB (do inglês "occluded body"). A principal diferença morfológica entre os dois gêneros está na conformação deste corpo de oclusão. No caso dos NPV é um corpo de oclusão poliédrico podendo ser chamado de poliedro, composto por subunidades de poliedrina, uma proteína de cerca de 29000 daltons que corresponde a 95% do conteúdo protéico do OB (Maruniak,

1986). Os OB podem variar de 0,15 a 15 μm em diâmetro, contendo vários vírions em seu interior (Bilimoria, 1991). Já no caso de GV, o OB se trata de um grânulo na forma ovicilíndrica composto pela proteína granulina, com peso molecular similar ao da poliedrina. O grânulo mede cerca de 0,3 x 0,5 μm , contém um vírion por grânulo podendo raramente apresentar dois a três vírions por grânulo (Crook, 1991).

Os GV são ainda pouco estudados, em especial por que existe uma dificuldade do estudo desses vírus *in vitro* por limitações de sua replicação viral em cultura de insetos (Winstanley & Crook, 1993) e por apresentar uma gama de insetos hospedeiros bastante reduzida (Dwyer & Granados, 1988; Funk & Consigli, 1992). Os NPV por sua vez são encontrados em mais de 600 espécies hospedeiras (Federici, 1997) e diferentes linhagens de células de inseto podem ser utilizadas como culturas de células hospedeiras (Miller, 1997). Os NPV podem ser divididos em SNPV ("Single" *nucleopolyhedrovirus*) quando apresentam apenas um nucleocapsídeo por vírion ou MNPV ("Multiple" *nucleopolyhedrovirus*) ao apresentar vários nucleocapsídeos por vírion (Bilimoria, 1991; Van Regenmortel *et alli.*, 2000). Os NPV ainda podem ser classificados em grupo ou tipo I e II com base em estudos comparativos de análises filogenéticas de baculovirus em relação ao gene da poliedrina (Zanotto *et alli.*, 1993).

1.9. Estrutura do vírion

A porção *baculo* do nome *Baculoviridae* tem origem a partir da palavra latina *baculum* que significa bastão, caracterizando a forma do capsídeo das partículas virais desta família (Fields *et alli.*, 2001; O'Reilly *et alli.*, 1992). (Figura 5) O capsídeo possui de 40-50

nm de diâmetro e 200-400 nm de comprimento, podendo ser estendido para acomodar genomas maiores no caso de insertos de DNA em vírus recombinantes (O'Reilly *et alli.*, 1992). O genoma viral é composto por DNA dupla fita, circular, *supercoiled* variando em tamanho de 80 e 200 kilobases (kb) (Arif, 1986). Em apenas um único ciclo de infecção os baculovirus apresentam dois fenótipos distintos, o que o faz se destacar dentre os vírus conhecidos. Os dois fenótipos variam de acordo com o modo de disseminação do vírus: o vírus extracelular ou BV (do inglês "budded vírus") encontra-se presente na transmissão do vírus de célula a célula, dentro do mesmo inseto; já os vírus oclusos ou OB (do inglês "occlusion bodies") estão presentes na transmissão horizontal do vírus, ou seja, na transmissão do vírus de inseto para outro inseto (Smith *et alli.*, 1983b).

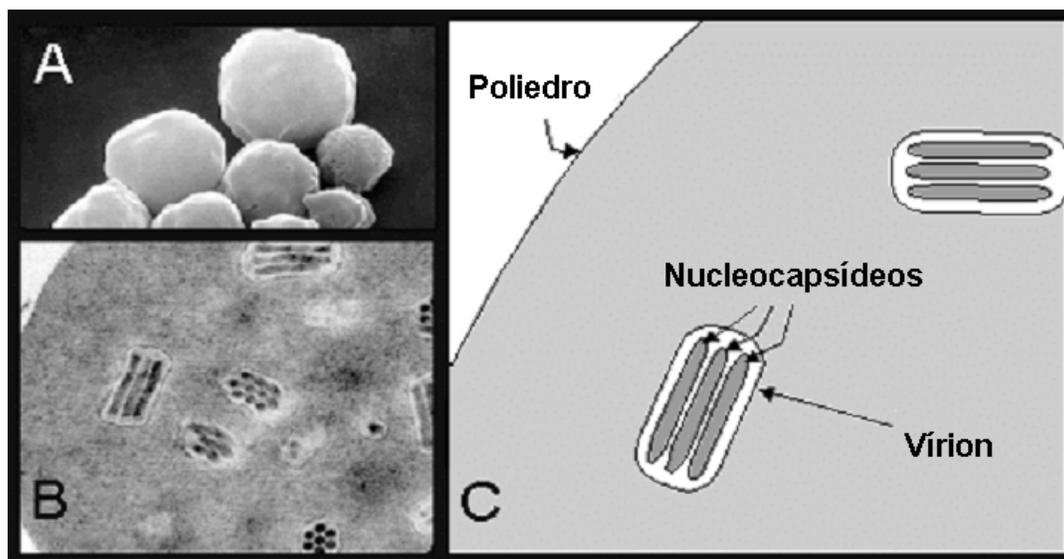


Figura 5: Estrutura do corpo de oclusão de um baculovírus. A) Micrografia eletrônica de varredura da superfície de corpos de oclusão (poliedros) de um *nucleopolyhedrovirus*; B) micrografia eletrônica de transmissão mostrando múltiplas partículas virais envelopadas (ODV) no interior de um poliedro; C) Desenho esquemático da organização interna do poliedro. Adaptado de http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/npv_g.gif

1.10. Modo de infecção *in vivo*

A infecção pelos baculovirus começa quando o inseto ingere alimento contaminado com o vírus na forma ocluída, o OB (poliedro no caso de NPV e grânulo no caso de GV) constituindo a rota natural de infecção. O OB pode compreender um ou mais vírions que se encontram protegidos do meio ambiente e da degradação ambiental pela matriz protéica cristalina que os envolve (Benz, 1986). Uma vez digeridos, seguem pelo trato intestinal da larva do inseto até chegar ao intestino médio onde o ambiente é altamente alcalino (pH 9,5 a 11,5) o que leva à dissolução do OB e liberação das partículas virais. Essas partículas virais dão início à infecção das células colunares epiteliais do intestino médio pela fusão dos nucleocapsídeos virais com a membrana das microvilosidades (Horton & Burand, 1993). Essa infecção é denominada primária e a partir dessa progênie viral é estabelecida a infecção secundária, ou seja, a disseminação do vírus para os outros tecidos do inseto que serão infectados subsequente (Volkman & Hom, 2000) (Figura 6).

As partículas virais estabelecem a infecção quando os nucleocapsídeos são transportados ao núcleo celular e ocorre a perda do capsídeo e a liberação do DNA ocorrendo subsequente transcrição por intermédio da maquinaria da célula hospedeira. Novos nucleocapsídeos são produzidos e estes são então transportados para a região basolateral das células colunares do intestino médio que são células que atravessam a lâmina basal. Isso permite que os nucleocapsídeo liberados na região basolateral ganhem acesso a vias para o deslocamento do vírus tanto para células epidermais da traquéia quanto para a hemolinfa (Engelhard *et alli.*, 1994). Além disso, os nucleocapsídeos que adentram

as células colunares podem atravessar a célula colunar e infectar diretamente os hemócitos ou células da traquéia (Engelhard *et alli.*, 1994). A infecção então se espalha rapidamente e ocorre a manifestação dos sintomas mais típicos de infecção por baculovirus: perda de apetite, clareamento da epiderme pelo acúmulo de vírus nos núcleos das células epidermais e adiposas, parada no desenvolvimento larval e diminuição de movimentos (Federici, 1997) seguida da morte do inseto. Quando a larva do inseto infectado morre, ocorre desintegração do seu tegumento e conseqüente liberação dos OB no ambiente, que podem então ser ingeridos por outras larvas de inseto. A quantidade de OB presentes em uma larva no estágio de infecção anterior à morte é bastante elevada e chega até 10^{10} OB nos NPVs e 10^{11} OB nos GVs (Payne, 1986) (Figura 6).

1.11. Modo de infecção *in vitro*: infecção de cultura de células de inseto

Muito do que se conhece hoje sobre baculovirus, em especial sobre a organização molecular e expressão gênica, cinética do processo de infecção e patogênese, só foi passível de ser estudado com o advento de técnicas que permitissem a avaliação da infecção viral *in vitro*, e, com este fim, foram estabelecidas culturas de células de inseto, permitindo a manipulação de condições que auxiliaram no estudo da infecção, replicação e biologia molecular desses vírus. De acordo com a ICTV cada gênero viral contém uma espécie-tipo e o *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) é a espécie-tipo dos NPV (Fauquet *et alli.*, 2005). Este vírus foi primeiramente isolado da lagarta *Autographa californica*, e é capaz de infectar diferentes insetos da ordem lepidóptera. O principal modelo de estudo hoje associado ao AcMNPV é na infecção de cultura de células

de inseto derivadas de *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni* (Williams & Faulkner, 1997).

Por ser a espécie-tipo, o modelo de replicação de AcMNPV é caracterizado e aceito como modelo para os outros baculovirus. Na replicação ocorre a produção das duas formas virais: o BV é produzido por volta de 12 a 24 h p. i. (horas pós-infecção) e, já na fase final da infecção, os OB são produzidos, no núcleo da célula, até a morte celular por volta de 72 h.p.i. Cabe lembrar que os BV produzidos no início da infecção irão propagar a infecção às outras células e disseminar a infecção nos tecidos do inseto e que, após a morte da lagarta, os OB serão os grandes responsáveis pela propagação da infecção a outras lagartas. Os BV dos NPV são caracterizados pela presença de um nucleocapsídeo simples envolto por envelopes frouxos, derivados da membrana plasmática, contendo ainda projeções na superfície denominadas peplômeros, compostas de uma glicoproteína viral denominada GP64, responsável por intermediar a endocitose do vírus via receptor. (Hess & Falcon, 1977; Volkman, 1986; Blissard, 1996). O que acontece no interior da vesícula endocítica é semelhante ao que acontece com o vírus da Dengue ou mesmo o Influenza, uma fusão da membrana endossomal com o envelope viral (aqui mediado pela proteína do envelope GP64, presente em todos os baculovírus classificados como NPV do tipo I) dependente de pH ácido, promovendo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula (Blissard, 1996).

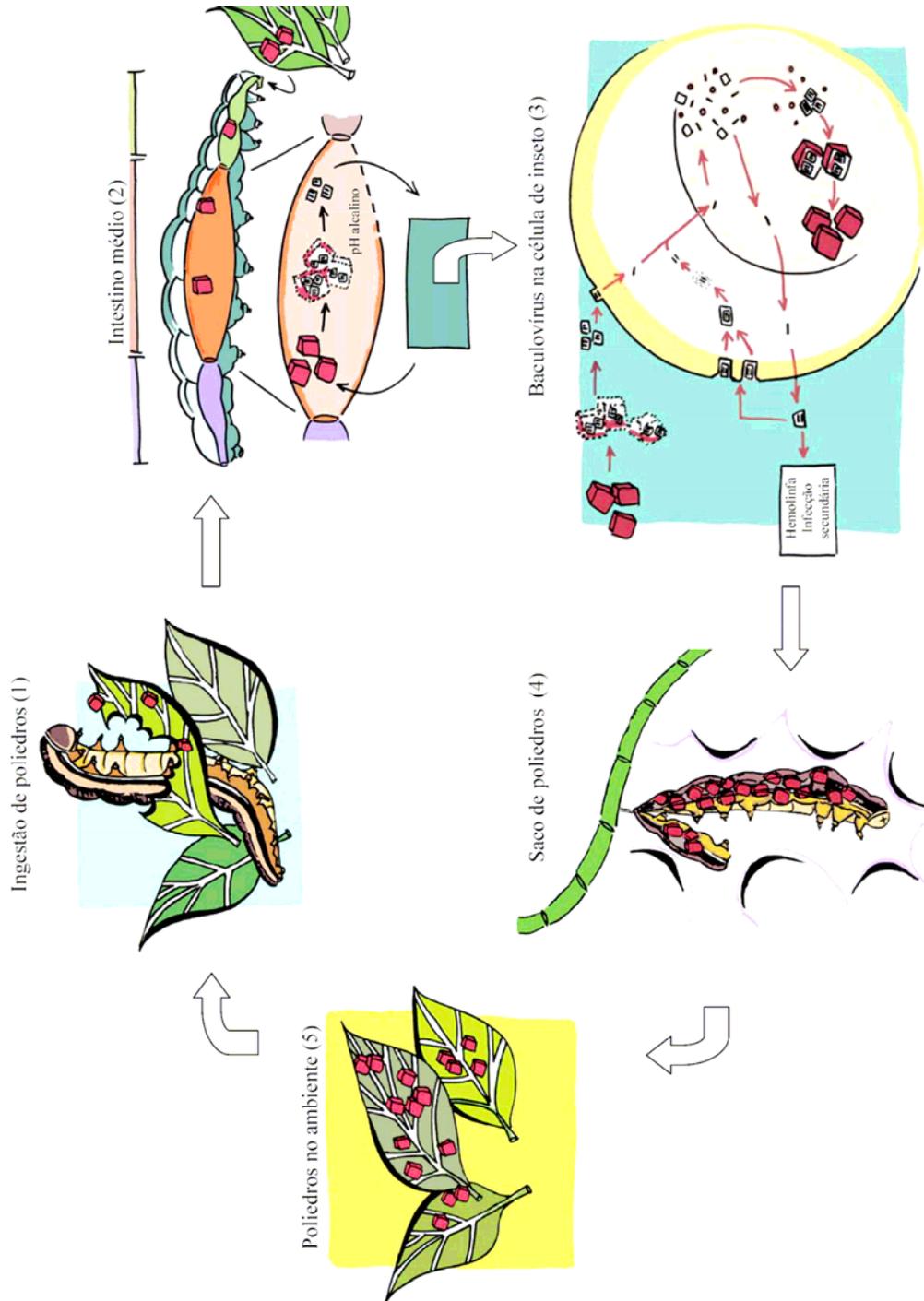


Figura 6: Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção *in vivo* de uma larva de lepidóptera infectada por um baculovírus. Em (1) ocorre a ingestão de poliedros pela larva do inseto e, após ingeridos, estes seguem pelo trato digestivo (2) até chegarem ao intestino médio e sofrem dissolução pelo baixo pH e liberam as partículas virais. Com a passagem pela membrana peritrófica, o vírus pode infectar células colunares (caracterizando a infecção primária) e, em seguida, partir para infectar outros tipos celulares permitindo a disseminação do vírus pela hemolinfa (caracterizando a infecção secundária) (3). A infecção se espalha, causando a morte da larva (4) e ela se torna um “saco” de poliedros que, quando se rompe, libera os poliedros no ambiente tornando-se fonte de infecção para outras lagartas (5).

1.12. Fases da infecção viral: regulação da expressão gênica

A expressão gênica viral durante uma infecção com o baculovírus AcMNPV pode ser dividida em dois estágios principais: o primeiro estágio compreende o período em que o vírus se prepara para replicar seu material genético, fase que precede a replicação do DNA viral e é conhecida como etapa inicial (fase inicial ou "early"); na etapa tardia (fase tardia ou "late") ocorre a expressão de genes pós-replicação do DNA viral. Algumas subdivisões são bastante utilizadas e são representadas pelas fases: imediata ("immediately early") correspondendo a genes expressos logo nas primeiras horas de infecção e muito tardia ("very late"), representando os genes expressos após 18 h de infecção. Nessa última fase, a proteína viral mais produzida nos NPV é a poliedrina; ela é produzida em grande quantidade uma vez que ocorreu um desligamento da expressão de proteínas celulares pela infecção viral e este fato é de grande importância para o uso do baculovirus como vetor de expressão (Maruniak, 1986).

A fase precoce ocorre antes da replicação do DNA viral, a partir de 30 min p.i. até aproximadamente 8 h.p.i.. Os genes expressos durante a fase inicial correspondem principalmente a fatores de transcrição mas também podem ser proteínas pertencentes à maquinaria de replicação do DNA viral. Esses genes são prontamente reconhecidos pelo complexo de transcrição celular, sendo, por esse motivo, expressos rapidamente. (Passarelli & Miller, 1993; Xu *et alli.*, 1995; Todd *et alli.*, 1996; Guarino *et alli.*, 1998; Gross & Shuman, 1998). É uma fase na qual o vírus é totalmente dependente da célula hospedeira já que os genes necessários para a replicação dependem RNA polimerase II do hospedeiro

para serem expressos e serão requeridos para o processo de replicação viral que ocorre posteriormente (Ribeiro & Crook, 1998).

A fase tardia ocorre logo após o DNA viral começar a ser replicado, envolvendo a produção de proteínas responsáveis pela montagem do vírus, ou seja, pela construção das partículas virais extracelulares (BV), persistindo até aproximadamente 24 h.p.i. Nesta fase ocorre o desligamento da produção de proteínas celulares e intensa produção dos BV (Lu & Miller, 1997). Além do processo de montagem, os genes tardios também estão envolvidos no processo de oclusão (Jarvis *et alli.*, 1996; Thiem *et alli.*, 1996; Lu & Miller, 1997) e ocorre uma super produção da proteína denominada poliedrina, que compõe a estrutura principal do OB. Essa etapa culmina com a lise celular aproximadamente 72 h.p.i. (Lu & Miller, 1997).

1.13. Sistema de Expressão Baculovirus

Os baculovirus são considerados ótimos bioinseticidas, especialmente devido à sua alta especificidade de hospedeiro (cada tipo de inseto é susceptível a um tipo de baculovirus diferente) e a ausência de risco na sua utilização para a espécie humana (não são capazes de se replicar ou estabelecer uma infecção em hospedeiros não artrópodes). O maior programa de controle biológico utilizando baculovirus está estabelecido no Brasil e utiliza a espécie *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV). Foi estabelecido em 1977 pelo Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSO -EMBRAPA - Londrina-PR), pois o vírus ataca inicialmente lagartas predadoras da lavoura de soja (Moscardi, 1999).

Além disso, os baculovirus hoje são amplamente utilizados como vetores de expressão em células de inseto e o sistema Baculovirus de expressão baseia-se na inserção de genes de interesse no genoma do baculovirus sob o comando de um promotor forte. No modelo mais comumente utilizado o gene de interesse é inserido sob o controle do promotor da poliedrina. Uma grande variedade de proteínas foram expressas em células de inseto desde o primeiro relato da clonagem do β -interferon (Smith *et alli.*, 1983a) e da β -galactosidase (Pennock *et alli.*, 1984) em células de *Spodoptera frugiperda* (Castro *et alli.*, 1999). Com relação a flavivirus, existem relatos de expressão de proteínas do vírus da Febre amarela (Despres *et alli.*, 1991), da hepatite C (Baumert *et alli.*, 1998), da encefalite transmitida por carrapato, TBE do inglês “tick-borne encephalitis” (Marx *et alli.*, 2001) além de inúmeras proteínas do vírus do Dengue (Staropoli *et alli.*, 1996; Staropoli *et alli.*, 1997; Bielefeldt-Ohmann *et alli.*, 1997).

Dentre as principais vantagens para utilização desses vetores estão: possibilidade de clonagem de genes grandes de interesse (uma vez que a própria organização do capsídeo permite a acomodação de genomas de DNA maiores) (O'Reilly *et alli.*, 1992); alto potencial para expressão de proteínas heterólogas em grande quantidade, mantendo a média de 10 a 100mg de proteína de interesse por litro de cultura e podendo chegar até um grama de proteína por litro de cultura; adequado à expressão em culturas de células de inseto, e apropriado para a síntese de proteínas eucarióticas; simplicidade de manipulação quando comparado a outros vetores de expressão (Castro *et alli.*, 1999). Essa última característica vem sendo cada vez mais explorada com o intuito de tornar esse sistema o mais popular e acessível possível. Assim, muitas metodologias foram aprimoradas e eliminaram procedimentos antes de difícil execução e reprodutibilidade (Kost *et alli.*, 2005).

Um bom exemplo para isso seria a comparação entre o procedimento original de recombinação homóloga com modelos novos de transposição. No procedimento original, são utilizados plasmídeos como vetores de transferência e estes por sua vez contêm certas seqüências flanqueadoras com seqüências homólogas à seqüências do vírus selvagem além do gene de interesse. Assim, quando é feita uma co-transfecção para a célula de inseto, ocorre uma troca de insertos, por recombinação homóloga, e o gene original no vírus é substituído pelo gene de interesse contido no plasmídeo. Na célula serão produzidos vírus selvagens e vírus recombinantes e esse último será selecionado por plaqueamento em células infectadas (Castro *et alli.*, 1999).

Em um modelo novo que utiliza a técnica de transposição, o gene de interesse é também clonado em um plasmídeo, só que este plasmídeo contém regiões flanqueadoras de transposição. No processo é necessária a utilização de uma bactéria especial que contém além do seu próprio genoma o genoma de um baculovirus na forma de um grande plasmídeo (denominado bacmídeo) e um plasmídeo contendo o gene da transposase. Esta transposase será responsável pela transposição do gene de interesse para o genoma do baculovirus, que é utilizado na transfecção de células de inseto. Este sistema mostrou-se mais popular entre os interessados em utilizar baculovirus para expressão, especialmente porque elimina a fase de seleção e purificação do vírus recombinante além de aumentar a quantidade de vírus recombinantes obtidos, pois a taxa de sucesso da recombinação homóloga era bastante baixa e por isso, menos favorecida em uma utilização comercial. (Kost *et alli.*, 2005).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho visou a expressão de proteínas do vírus da Dengue em células de inseto utilizando o sistema Baculovírus e a construção de células estáveis.

2.1. ESTRATÉGIAS

1. Clonagem dos genes do envelope e do envelope+NS1 no vetor pGEM-T Easy;
2. Clonagem dos genes do envelope e do envelope+NS1 no vetor pFastBac1;
3. Construção de bacmídeos BacDE e BacDENS1;
4. Obtenção dos baculovírus recombinantes vAcDE e vAcDENS1;
5. Análise da expressão dos genes do envelope e envelope+NS1 em células de inseto infectadas com os vírus recombinantes;
6. Avaliação da expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE e Imuno-detecção;
7. Avaliação do potencial de causar fusão de membranas em pH ácido dos vírus recombinantes em células de inseto;
8. Construção de um plasmídeo de transferência contendo o gene NS1 para construção de célula estável.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos genes do envelope e NS1

O RNA viral foi extraído de uma cultura de células C6/36 de *Aedes albopictus* infectada com um isolado viral do Distrito Federal de Dengue 1 (gentilmente cedido pelo Dr. Tatsuya Nagata da Universidade Católica de Brasília – UCB). Fez-se o descarte do sobrenadante e o sedimento (concentrado de células) foi utilizado para a extração do RNA total com 500µL de Trizol® LS (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). Dois cDNAs (fita de DNA complementar) diferentes foram sintetizados utilizando o oligonucleotídeo **NS1 PVX Rev** (cDNA1) ou o oligonucleotídeo **E PVX SalI Rev** (cDNA2) (Tabela 1) e o Kit M-MLV-RT, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). A partir do cDNA1 obtido, foram feitas duas reações de PCR para amplificar segmentos de DNA de interesse utilizando pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene: **NS1 PVX For** e **NS1 PVX Rev** (Tabela 1) para a região do gene não –estrutural NS1 (NS1) e **E PVX AscI For** e **NS1 PVX Rev** (Tabela 1) para região que corresponde aos genes do envelope e NS1 juntos (EnvNS1). A partir do cDNA2, foi feita apenas uma reação de PCR com os oligonucleotídeos correspondentes à região do gene do envelope (Env), **E PVX AscI For** e **E PVX SalI Rev** (tabela 1).

Para a reação de PCR foram utilizados 5 µL do tampão A 10 X e 5µL do tampão B 10X da enzima Elongase® Enzyme Mix (Invitrogen), e 4 µL da mistura dos quatro dNTPs (de uma solução estoque 2,5mM), 1 µL de cada um dos oligonucleotídeos (de uma solução estoque 10 µM), 1 µL do cDNA, uma unidade da enzima Elongase® Enzyme Mix

Tabela 1: Lista dos oligonucleotídeos usados no trabalho

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'→3')	Utilização/Localização
RTENV1D1	<u>GACACAGCATGGGACTTCGGTTCATAGGA</u>	RT-PCR (Análise do mRNA de células infectadas com os vírus recombinantes); localizado a 1.249 nucleotídeos do começo do gene do envelope
RTNS1D1	TTGTTGTGGATGAACATTGTGGAAATCGAG	RT-PCR (Análise do mRNA de células infectadas com os vírus recombinantes); posicionado a 855 nucleotídeos do começo do gene NS1
E PVX AscI For	AGGCGCGCC <u>ATGGCCATGCGATGCG</u>	PCR; Posicionado à 930 nucleotídeos do início do genoma do <i>dengue virus</i>
E PVX SalI Rev	ACGCGTCGACTTACGCTTGAACCATG Na seqüência (3'→5') <u>CATGGTTCAAGCGTAAGTCGACGCGT</u>	PCR; Posicionado a 2407 nucleotídeos do início do genoma do <i>dengue virus</i>
NS1 PVX For	AGGCGCGCCATGG <u>ACTCGGGATGTGTAATCAA</u>	PCR; Posicionado a 2419 nucleotídeos do início do genoma <i>dengue virus</i>
NS1 PVX Rev	CCCGTCGACTTATGCAGAGACCATTGACCTAA Na seqüência (3'→5') <u>TTAGGTCAATGGTCTCTGCAATAGTCGACGGG</u>	PCR; Posicionado a 3457 nucleotídeos do início do genoma <i>dengue virus</i>

T1	CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	RT-PCR (Análise do mRNA de células infectadas com os vírus recombinantes); anela-se na cauda de Poli-A
T2	CCTGCAGGATCCTTAGGTT	RT-PCR; idêntico aos primeiros 19 nucleotídeos do oligonucleotídeo T1
polHF	TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG	Primer “Forward; posição -45 no promotor da poliedrina
M13 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Primer Reverso; utilizado na confirmação da posição do inserto no bacmídeo presente nas células DH10 Bac (Invitrogen).. Localizado a 145 pb da região de transposição no bacmídeo (mini-att TN7)

(Invitrogen) e água “milli-Q” para um volume final de 50 μ L. O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 80°C/1 min (pré-aquecimento do termociclador; a amostra sai direto do gelo para o termociclador, evita que a polimerase comece a agir de maneira inespecífica ou não desejada), 94°C/1 min, 30 ciclos de 94°C/15 s, 55°C/1 min, 68°C/3 min (temperatura especial para enzima *Elongase*) seguido de uma extensão final de 68°C/20 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose na concentração de 0,8%, segundo protocolo descrito em Sambrook *et alli.*, (1989).

Os fragmentos amplificados foram eluídos do gel de agarose utilizando o kit DNA Perfect Gel Cleanup Procedure (Eppendorf), conforme instruções do fabricante. A enzima *Elongase*, diferente do que acontece com a enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), possui 50% de atividade High Fidelity (alta fidelidade, ou seja, é uma enzima com atividade “proof-reading” o que significa que promove revisão das fitas recém-sintetizadas para evitar adição de erros de mutação) e, assim, 50% dos produtos amplificados de PCR não possuirão o nucleotídeo extra com a base adenina nas extremidades de cada fita. Para que o plasmídeo pGEM-T pudesse ser utilizado na posterior clonagem (tomando como base sua principal característica de facilitar a clonagem de produtos de PCR por conter nucleotídeos com base timidina nas extremidades de cada fita) se mostrou necessário promover a adição de nucleotídeos de base adenina aos produtos de PCR, o que foi feito por um procedimento denominado “A Overhang”. O procedimento se assemelha muito ao princípio de uma reação de PCR tradicional, como se fosse uma reação de PCR “reduzida”. Os produtos de PCR eluídos do gel seguem para o secador do tipo DNA SpeedVac DNA 110 (Savant) e toda a água é perdida permitindo o aumento na concentração do material de interesse que pode ser ressuspensionado em qualquer volume. Nesse caso o material foi

ressuspendido em 8,68 μL de água milliQ, 0,12 μL de nucleotídeos com base adenina, 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 μL de tampão 10X da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Essa reação permaneceu por 30 min no termociclador a 72°C. Esse material foi avaliado por eletroforese em gel de agarose, a banda de interesse foi eluída com o auxílio do kit de eluição DNA Perfect Gel Cleanup Procedure (Eppendorf), conforme instruções do fabricante, e quantificada por avaliação de eletroforese em gel de agarose. A seguir, foi utilizada na reação de ligação com o plasmídeo pGEM-T easy (Promega) conforme é explicado logo a seguir caracterizando a fase de clonagem.

3.2. Clonagem e seqüenciamento de Env, NS1 e EnvNS1

Os fragmentos de 1500 pb (Env) e 2500 pb (EnvNS1) purificados foram utilizados na reação de ligação com o plasmídeo pGEM-T easy (Promega) (Figura 7) seguindo as recomendações do fabricante.

As ligações foram utilizadas na transformação, por eletroporação, descrito em Sambrook *et alli* (1989), de células competentes de *E. coli* One Shot® Top10 Competent Cells (Invitrogen). Os insertos clonados no vetor pGEM-T easy (Promega) foram amplificados em *E. coli*, em meio LB de acordo com protocolo descrito em Sambrook *et alli* (1989). Três diferentes tipos de plasmídeo foram obtidos: pGEM-T easy com o inserto Env foi denominado DE, com o inserto de NS1 foi denominado DNS1 e com Env e NS1 foi denominado DENS1. Os clones positivos foram confirmados por três diferentes métodos: pela resistência à ampicilina (só sobrevivem no meio de cultura com antibiótico as bactérias que receberam com sucesso o plasmídeo de interesse, uma vez que pGEM-T

easy possui um gene que confere resistência à ampicilina tornando-a uma marca de seleção); por reação de digestão utilizando a enzima de restrição *Not* I e posteriormente por seqüenciamento pelo laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília - UCB, em seqüenciador ABI 377 da Applied BioSystem. Depois de confirmadas, as seqüências foram alinhadas e submetidas à análise de BLAST e analisadas no programa Sequencher (Genes Codes).

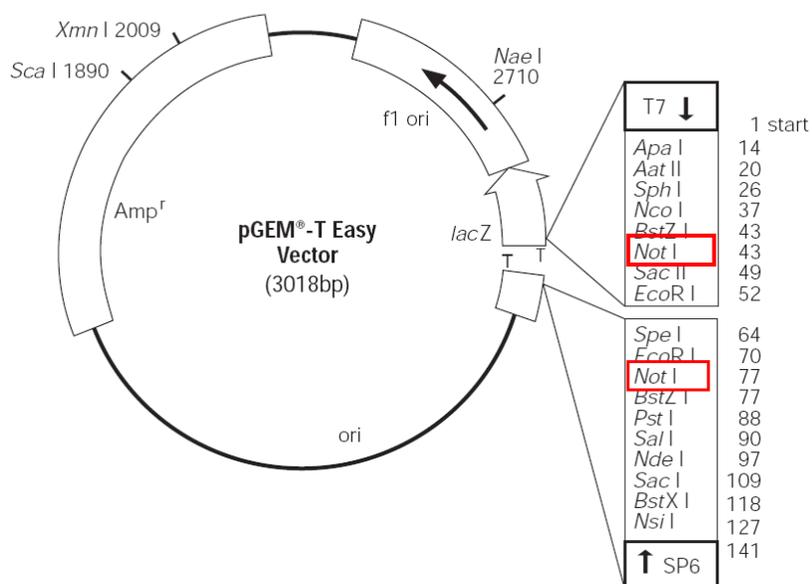


Figura 7: Plasmídeo pGEM-T Easy (Promega). Sítio de multiclonagem mostrado à direita; em vermelho o sítio de restrição *Not* I escolhido para a clonagem do inserto de interesse.

Para obtenção de grandes quantidades do inserto, os clones positivos de DENS1, DE e DNS1 foram crescidos em larga escala. Para isso, clones de bactérias já confirmadas quanto à presença do inserto foram inoculados em 500ml de meio de cultura L-Broth (Tryptona 10 g/l; Extrato de levedura 5 g/l; NaCl 5 g/l) e incubados a 37 °C com agitação por 16 h. Essas células foram centrifugadas por 10 min a 4.000 rpm (centrifuga J2-MI, rotor

JA 14, Beckman) e o pellet (concentrado de bactérias) foi ressuspendido em 4 ml de tampão de LISE, mais conhecido por Solução I (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA). Após 10 minutos, 20 ml de SDS alcalino (0.2 N NaOH; 1% SDS) foram adicionados e a solução ficou à temperatura ambiente por mais 10 min antes de receber a última solução de acetato de potássio 3 M pH 4.8 e seguir para um isopor com gelo para ser incubada por 10 min. Uma nova centrifugação por 10 min a 5.000 rpm (centrífuga J2-MI, rotor JA 14, Beckman) foi realizada e a mistura foi filtrada utilizando pano de fralda. Este filtrado foi precipitado com 0,6 X o volume de isopropanol e incubado a -20 °C por 1 hora. O DNA precipitado foi centrifugado a 10.000 rpm (centrífuga J2-MI, rotor JA 14, Beckman) por 10 min, o pellet foi lavado com etanol 70% em uma nova centrifugação e, depois de seco foi ressuspendido em 1 ml de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Esse preparado de plasmídeos foi purificado pela técnica de polietilenoglicol descrita em Sambrook *et alli.* (1989) e o DNA purificado foi utilizado em reação de digestão que, no caso de DE e DENS1 utilizou a enzima de restrição *Not* I, seguindo as instruções do fabricante (Jena Bioscience) e no caso de DNS1 utilizou a enzima de restrição *Eco* RI, que está presente no sítio de multiclonagem flanqueando o gene, seguindo as instruções do fabricante (Promega). Os resultados das digestões foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As bandas referentes aos genes Env de 1500 pb (DE+*Not* I), NS1 de 1000 pb (DNS1+*Eco* RI) e EnvNS1 de 2500 pb (DENS1 +*Not* I) foram eluídas do gel, utilizando-se o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) seguindo as recomendações do fabricante.

3.3. Construção dos vetores pFastDE e pFastDENS1

Os fragmentos de 1500 pb (Env) e 2500 pb (EnvNS1) purificados foram adicionados a uma reação de ligação utilizando a enzima T₄ DNA ligase (Invitrogen) e o plasmídeo pFastBac1 (Figura 8) previamente digerido com a enzima de restrição *Not* I e desfosforilado por reação utilizando a enzima CIAP - Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

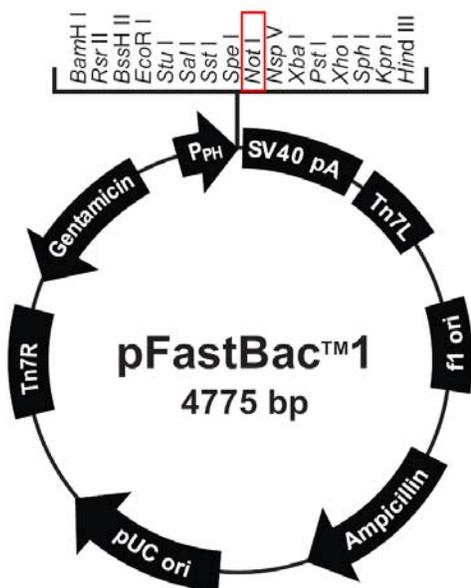


Figura 8: Plasmídeo pFastBac1 (Invitrogen). Sítio de multiclonagem localizado na parte superior da figura; em vermelho, sítio de restrição *Not* I escolhido para a clonagem do inserto de interesse.

As ligações foram utilizadas na transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) e aquelas que adquiriram resistência à ampicilina foram utilizadas na

obtenção dos plasmídeos pFastEnv (Env) e pFastDENS1 (EnvNS1). O plasmídeo pFastBac1 é um vetor que permite que o inserto de interesse seja posteriormente transferido para o genoma de um baculovirus presente na forma plasmidial (bacmídeo) dentro de uma *E. coli* (DH10-Bac, Invitrogen) por um mecanismo de transposição. Os genes de interesse são inseridos em um dos sítios presentes na região de multiclonagem e devem estar posicionados entre os sítios de transposição, logo após o promotor da poliedrina.

A clonagem pôde ser confirmada com a realização de algumas reações de PCR. Para pFastDE foram utilizados os oligonucleotídeos **E PVX AscI For** e **E PVX Sall Rev** (Tabela 1) para confirmar a presença do inserto e **polHF** e **E PVX Sall Rev** (Tabela 1) para a confirmação da direção. Para pFastDENS1 foram utilizados os oligonucleotídeos **E PVX AscI For** e **NS1 PVX Rev** (Tabela 1) para confirmar a presença do inserto, **polHF** e **E PVX Sall Rev** e **polHF** e **NS1 PVX Rev** (Tabela 1) para a confirmação da direção. Para a reação de PCR foram utilizados 5 µL do tampão 5 X da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e 0,5 µL da mistura dos quatro dNTPs (de uma solução estoque 10 mM), 0,5 µL de cada um dos oligonucleotídeos (de uma solução estoque 10 µM), 3 µL de preparado de plasmídeos pFastDE ou pFastDENS1 (obtido pela técnica extração de plasmídeos de culturas bacterianas descrita em Sambrook *et alli* (1989), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2 µL de MgCl₂ e água “milli-Q” para um volume final de 25 µL. O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/1 min, 50°C/1 min e 30 s, 72°C/2 min, seguido de uma extensão final de 72°C/7 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose na concentração de 0,8%.

3.4. Construção dos bacmídeos recombinantes BacDE e BacDENS1

Na construção dos bacmídeos recombinantes de interesse foi utilizada uma linhagem de bactéria *E. coli* denominada DH10Bac que possui dentre as suas características especiais o genoma completo de um baculovírus (*Autographa californica multiplex nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) na forma de um plasmídeo. O bacmídeo contém um sítio de inserção de um transposon no locus da poliedrina e ainda um plasmídeo ajudante ("helper"), que codifica transposases responsáveis pelo evento de transposição entre o plasmídeo doador (pFastBac1 com o inserto) e o genoma do baculovírus inserido no bacmídeo (Figura 9).

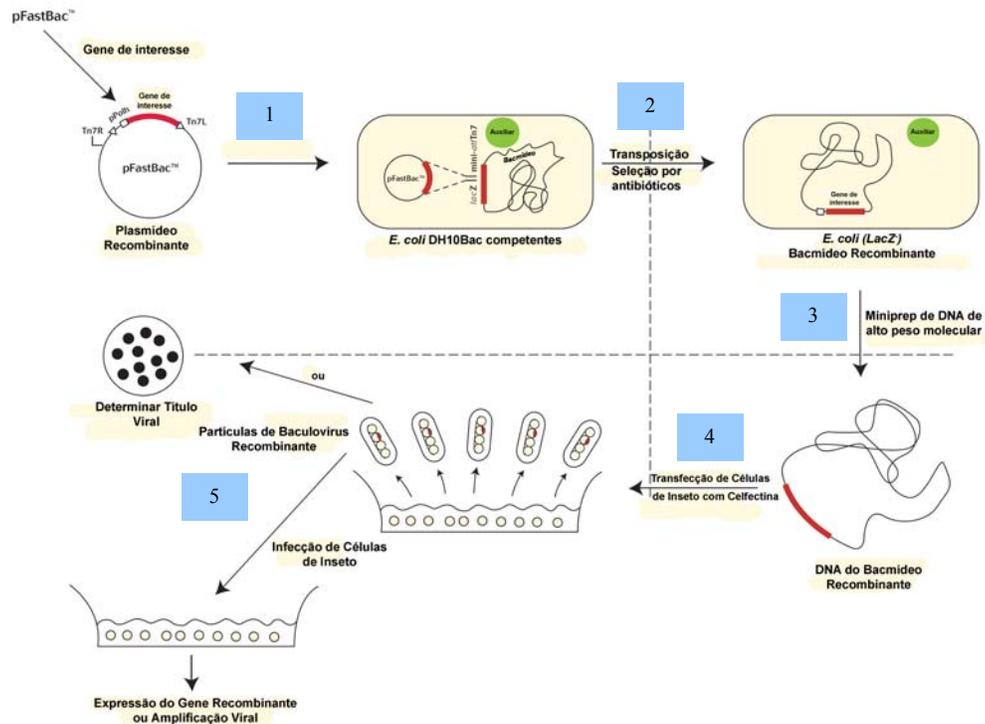


Figura 9: Sistema Bac-to-Bac de expressão. A figura mostra a transformação de bactérias DH10Bac, que contém o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de um bacmídeo, com o plasmídeo pFastBac1 com o inserto de interesse em vermelho (1). Logo a seguir é mostrado o evento de transposição (2), que permite a inserção do gene de interesse no bacmídeo e a seleção por antibióticos, seguido pela extração do DNA do bacmídeo (3) e utilização desde na transfecção de células de inseto (4). Os vírus recombinantes obtidos podem ser avaliados quanto ao seu título viral ou ainda utilizados para infectar novas células e promover a produção da proteína recombinante (5). Adaptado de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System manual (Invitrogen).

Os plasmídeos pFastDE e pFastDENS1 foram utilizados na transformação de bactérias DH10Bac seguindo a orientação do fabricante (Invitrogen). As colônias das bactérias *E. coli* DH10Bac nas quais ocorreu transposição foram selecionadas pela observação de demonstração de resistência à tetraciclina, kanamicina (genes de resistência presentes em todas as bactérias DH10Bac) e gentamicina (gene de resistência presente apenas nas bactérias nas quais o evento de transposição obteve sucesso, ele se encontra entre os sítios de transposição de pFastBac1) e, além disso, foram identificadas pela cor branca mesmo na presença do substrato X-gal e indutor IPTG. A ausência de cor (cor branca) ocorre apenas se o gene da enzima β -galactosidase presente no bacmídeo for interrompido pelo evento de transposição. Caso isso não ocorra, o gene estando íntegro permitirá que essa enzima seja produzida e aja sobre o seu substrato (X-gal) provocando a produção da cor azul. Essas colônias foram amplificadas em larga escala e seu material genético foi extraído seguindo orientações do fabricante (Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen). Por se tratar de um DNA de alto peso molecular e de baixo número de cópias, a confirmação de transposição é feita por PCR e não por restrição.

A transposição pôde ser confirmada com a realização de uma reação de PCR recomendada pelo fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados para checar a presença e orientação do inserto são: primer M13 reverso (Tabela 1) utilizado junto ao primer Forward do gene de interesse (para BacDE e BacDENS1 o primer forward escolhido foi o **E PVX AscI For**). Na reação de PCR de BacDENS1 foram utilizados 5 μ L do tampão 10X da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 μ L da mistura dos quatro dNTPs (de uma solução estoque 10mM), 1,25 μ L de cada um dos oligonucleotídeos (de uma solução estoque 10 μ M), 1 μ L do DNA do bacmídeo recombinante (100ng), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase

(Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ (de uma solução estoque 50 mM) e água “milli-Q” para um volume final de 50 µL. O PCR de BacDE foi feito utilizando 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega), 1 µL do DNA do bacmídeo recombinante (100 ng), 1 µL de cada um dos oligonucleotídeos (de uma solução estoque de 10 µL) e água “milli-Q” para um volume final de 25 µL. O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 93°C/3 min, 35 ciclos de 94°C/45 s, 55°C/45 s, 72°C/5min, seguido de uma extensão final de 72°C/7 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose na concentração de 0,8%.

3.5. Obtenção dos baculovirus recombinantes

Cerca de $0,5 \times 10^6$ células de *Trichoplusia ni* (BTI-TN5B1-4 ou TN5B), em cultura (Granados *et alli.*, 1994) foram transferidas para uma placa de poliestireno de 35 mm de diâmetro (TPP) por pelo menos 1 h, para a formação de monocamadas de células. Um micrograma de DNA do bacmídeo BacDE e do bacmídeo BacDENS1 foram diluídos em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro, cada um em uma placa de 35 mm de diâmetro. Em outra placa, 10 µL de Cellfectin® Reagent (Invitrogen) (lipossomo) foram diluídos em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro e misturados à solução contendo o DNA e incubados por pelo menos 10 min à temperatura ambiente. O meio de cultura das células foi substituído pela mistura de DNA/lipossomos sem que isso perturbasse a monocamada formada e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 3 h.

Após esse período, a mistura foi trocada por meio TC-100 novo, contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram então incubadas a 27 °C, por sete dias. A grande

vantagem da utilização desse sistema é que o mecanismo de transposição não necessita de uma série de purificações que seriam fundamentais para o isolamento do vírus recombinante quando da utilização do mecanismo de recombinação homóloga. Como o DNA do bacmídeo é infectivo e não ocorre a produção de vírus selvagem, uma vez que só o recombinante é selecionado previamente, ocorre a replicação do vírus recombinante em células de inseto em cultura e a produção de suas proteínas, inclusive dos insertos de interesse. Os vírus recombinantes obtidos foram denominados vAcDENS1 (relativo às células que receberam o bacmídeo BacDENS1) e vAcDE (relativo às células que receberam o bacmídeo BacDE).

3.6. Análise transcricional (RT-PCR)

Células TN5B (5×10^6) em um frasco estilo garrafa de poliestireno de 75 cm² (TPP) foram infectadas com 10 unidades formadoras de placa (pfu) /célula dos vírus recombinantes. Setenta e duas horas pós-infecção (h.p.i.), as células foram ressuspendidas e o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4.000 r.p.m. por 10 min (centrífuga J2-MI, rotor JA 14, Beckman). Fez-se o descarte do sobrenadante e o sedimento (concentrado de células) foi utilizado para a extração do RNA total com o kit illustra RNAspin Midi Isolation Kit (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Ao final, o RNA foi eluído em 50 µL de água milliQ dos quais 10µL foram utilizados para a confecção do cDNA. Na reação de transcriptase reversa o cDNA foi sintetizado utilizando o oligonucleotídeo T1 capaz de se anelar na região da cauda poli-A (Tabela 1) (Rodrigues *et alli*, 2001), e o Kit M-MLV-RT, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen).

A partir do cDNA obtido, foi feita uma reação de PCR para amplificar o cDNA correspondente ao RNA mensageiro dos genes do envelope e do envelope/NS1. O par de oligonucleotídeos utilizado só varia quanto ao oligonucleotídeo "forward", pois o reverso é o primer **T2** (tabela 1), capaz de se anelar à região do primer **T1** pois possui a sequência dos primeiros 19 nucleotídeos desse primer. No caso das células infectadas com vAcDE, a transcrição do gene do envelope foi checada utilizando o oligonucleotídeo específico para este gene (**E PVX AscI For**, tabela 1) e no caso das células infectadas com vAcDENS1 foram feitas 2 reações: uma com o oligonucleotídeo **RTENV1** (tabela 1) e outra com o oligonucleotídeo **RTNS1D1** (tabela 1). Para a reação de PCR foram utilizados 10 µL do tampão 5X da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1,0 µL da mistura dos quatro dNTP (10 mM cada), 3 µL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 1,0 µL do oligonucleotídeo T2 10mM e 1,0 µL do primer correspondente já descrito 1mM, 2 µL do cDNA respectivo, três unidades da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água milli-Q para um volume final de 50 µL. O programa da PCR utilizado foi: 94°C/5 min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 50°C/2 min, 72°C/3 min e uma extensão final de 72°C/10 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose a 0,8% e 2%.

Para confirmação do resultado, os fragmentos obtidos foram precipitados, utilizando-se 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3 M, pH 5.2 e 2 x o volume inicial de etanol absoluto e digeridos com enzima de restrição *Not* I (Promega). O resultado da digestão foi avaliado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% para o PCR **E PVX AscI For/T2** de vAcDE e vAcDENS1 e 2% para o **RTNS1D1/T2** de vAcDENS1.

3.7. Análise da expressão da proteína ENV e da proteína ENVNS1 em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e imuno-deteção

Larvas de *Spodoptera frugiperda* no terceiro ou quarto instar, gentilmente cedidas pela Dra Rose Gomes Monnerat e Dra Maria Elita Batista de Castro (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia), foram inoculadas com \pm 10-15 μ L do estoque de BV (aproximadamente 10^8 pfu/mL) do vírus vAcDE ou vAcDENS1 com ajuda de uma seringa de 1 mL e alimentadas com uma dieta artificial por 72 h.p.i. No 3º dia, as lagartas foram colocadas no gelo e posteriormente abertas para retirada do tecido adiposo. Esse tecido adiposo foi homogenizado em um tampão que inibe a ação de proteases (PMSF 1 mM, EGTA 40 mM e EDTA 100 mM) e filtrado com o auxílio de uma seringa com lã de vidro (O'Reilly *et alli.*, 1992). A uma alíquota de 10 μ L desse filtrado foi adicionado 10 μ L de tampão de amostra de proteína com 5% de β -mercaptoetanol e esse material foi incubado a 95 °C por 5 min. Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em dois géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% na cuba Mini Trans Blot® Cells (BioRad), conforme Laemmli (1970). Um dos géis foi corado e fixado em solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e Coomassie blue 0,1 %, por cerca de 16 h e descorado em solução de 40 % de metanol e 10% de ácido acético por 4 h, sob leve agitação. O outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Gibco BRL - Life Technologies), para o experimento de imuno-deteção de proteínas (“Western-blot”) abaixo descrito.

As proteínas foram transferidas para membrana de Nitrocelulose, usando-se os aparatos de transferência da Bio-Rad (Trans-Blot® SD – Semi Dry Transfer Cell, para

transferência semi-seca), de acordo com o protocolo do fabricante e com tampão de transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM de Tris; 39 mM de glicina; 20 % metanol, pH 9,2). Para checar se a transferência foi realizada com sucesso a membrana foi rapidamente corada por reagente de Ponceau, um corante que destaca as bandas transferidas em uma cor vermelho-viva. Esse corante é facilmente retirado por lavagem com água destilada e não interfere no processo de imuno-marcação. A membrana foi bloqueada com solução de PBS 1X e 3 % de leite em pó desnatado adicionado de azida sódica (para evitar contaminação) por 16 horas, sendo em seguida processada para a imuno-marcação.

O primeiro passo foi lavar a membrana por 3 vezes com PBS Tween (0,05 %) para retirar toda a solução de bloqueio e em seguida colocar a membrana em uma solução de PBS/albumina bovina (BSA) 0,5 % adicionada do anticorpo primário policlonal anti-Dengue (Rabbit anti-Dengue Type 1, 2 ,3 ,4 – Biodesign) de coelho por 1 hora. Essa solução é então descartada e a membrana é lavada novamente por 3 vezes em PBS Tween (0,05 %) sob agitação suave. A seguir, a membrana é colocada em uma solução de PBS/BSA 0,5 % contendo o anti-IgG de coelho (anticorpos que reconhecem IgGs de coelho) conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) por mais uma 1 hora sob agitação suave. Esta solução então é retirada e a membrana é lavada novamente com PBS Tween (0,05%) por 3 vezes e com o tampão da enzima fosfatase alcalina por 5 min com agitação suave. O revelador é adicionado logo a seguir, trata-se de uma solução de NBT/BCIP (Roche) que nada mais é do que o substrato para a ação da fosfatase alcalina. Quando a enzima está presente por estar conjugada ao anticorpo secundário que se ligou ao anticorpo primário e esse à banda de interesse, ocorre a metabolização desse substrato em uma cor azul arroxeadada que se destaca da membrana. A reação precisa ser interrompida com

sucessivas lavagens com água destilada para que não ocorra marcação inespecífica ou dano à qualidade do resultado obtido.

3.8. Construção de célula estável (DNS1)

O inserto de NS1 (1055pb) foi retirado de DNS1 (clonagem em pGEM-T easy) por reação de digestão utilizando a enzima de restrição *EcoR* I (Promega). O fragmento de interesse foi avaliado por eletroforese em gel de agarose, eluído utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) e utilizado para a ligação em um plasmídeo denominado pGEM HSP70 (construído e gentilmente cedido por Juliana Faria Nunes) utilizando a enzima T_4 DNA ligase (Invitrogen). O plasmídeo pGEM HSP70 contém o promotor *hsp70* de *Drosophila melanogaster* de cerca de 700pb entre os sítios de *Sac* I e *Pst* I do pGEM-T (Figura 10) e encontrava-se previamente digerido com a mesma enzima de restrição, *EcoR* I, e desfosforilado por reação utilizando a enzima CIAP - Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Promega) para permitir a clonagem do inserto de interesse sob controle do promotor *hsp70*. As ligações foram utilizadas na transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) e os clones resistentes à ampicilina foram selecionados para crescer em larga escala e obter o preparado de plasmídeos, conforme já descrito previamente. O plasmídeo construído com NS1 passou a ser chamado HSP70 NS1.

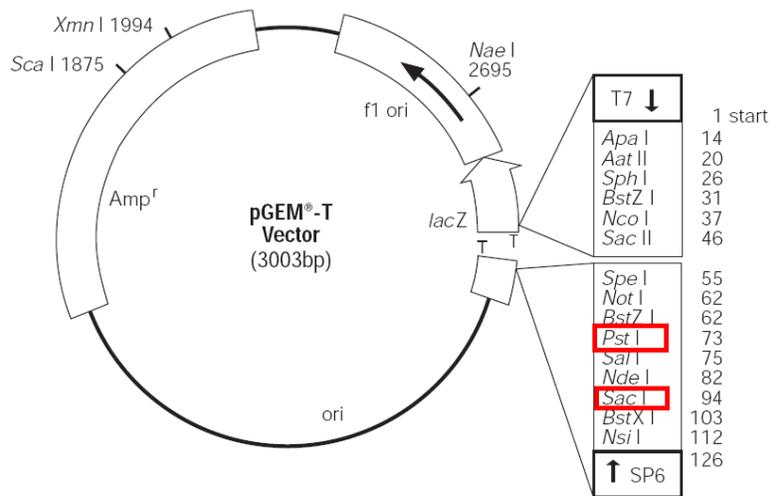


Figura 10: Plasmídeo pGEM-T (Promega). Sítio de multiclonagem à direita; em vermelho os sítios de restrição de *Pst* I e *Sac* I, escolhidos para a inserção do promotor hsp70 de *D. melanogaster*.

A confirmação da clonagem em pGEM HSP70 foi feita através da técnica de PCR utilizando os primers Reverso **NS1 PVX Rev** e Forward **SP6** (tabela 1), primer este que reconhece a região do promotor da enzima SP6 RNA polimerase que, juntamente à região T7, também um promotor de uma RNA polimerase (T7), também um promotor de RNA polimerase, flanqueiam o sítio de multiclonagem do plasmídeo. Na reação de PCR foi utilizado 3 μ L de DNA plasmidial de HSP70 NS1, 5 μ L do tampão 10X da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 0,5 μ L da mistura dos quatro dNTP (de uma solução estoque 10mM), 1 μ L de cada um dos oligonucleotídeos (de uma solução estoque 10 μ M), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 3 μ L de MgCl₂ (de uma solução estoque 50 mM) e água “milli-Q” para um volume final de 25 μ L. O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 94°C/5 min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 50°C/2 min, 72°C/3 min, seguido de uma extensão final de 72°C/10 min. O produto da reação de PCR foi analisados em gel de agarose na concentração de 0,8%.

Uma vez obtido o plasmídeo HSP70 NS1 confirmado, este foi utilizado em uma reação de co-transfecção em células de inseto juntamente com o plasmídeo pBSIE1Gpac pela Dra. Lois K. Miller da Universidade da Geórgia (Estados Unidos) (McLachlin *et alli.*, 1997) (Figura 11). Este plasmídeo contém um gene de resistência ao antibiótico puromicina sob o comando do promotor IE1 e fornece uma marca de seleção para identificar as células que eficientemente receberam este plasmídeo, que serão capazes de sobreviver em um meio contendo o antibiótico. Para garantir que as células receberão também o plasmídeo que contém o gene de interesse (HSP70 NS1), esse plasmídeo foi co-transfectado em maior quantidade do que o pBS IE1 gpac na proporção 1/10. Foram utilizados 2 µg de HSP70 NS1 para 200ng de pBS IE1 gPac. A co-transfecção foi feita utilizando cerca de 2×10^6 células de *Anticarsia. gemmatalis* (UFL-AG-286) (Sieburth & Maruniak, 1988) em cultura e o protocolo seguido foi o mesmo descrito na transfecção de BacDE e BacDENS1 em células de inseto, sendo que a única diferença é que serão transfectados dois plasmídeos ao invés de um só. A adição de puromicina (estoque de 5µg/µL) foi feita 48 h.p.i para a concentração final de 10 µg/mL de meio de cultura.

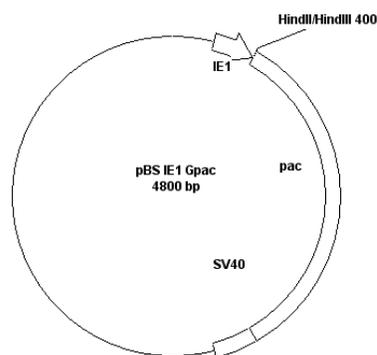


Figura 11: Plasmídeo pBS IE1 Gpac. Plasmídeo contendo o gene de resistência à puromicina sob o controle do promotor IE1 utilizado para construção de células estavelmente transformadas.

3.9. Ensaio de fusão

Células TN5B (5×10^6) em uma placa de poliestireno de 6 poços foram utilizadas em um ensaio para avaliação de fusão de membranas em pH baixo segundo protocolo descrito por Slack & Blissard, 2001. Para isso, 2 poços foram infectados com 10 unidades formadoras de placa (pfu) /célula do vírus recombinante vAcDENS1, 2 poços foram infectados pelo vírus vSyn VI Gal (derivado do AcMNPV com o gene do lac-Z no lugar da poliedrina (Lee & Miller, 1978) e os 2 poços restantes não foram infectados, caracterizando as células "mock" infectadas como controle. Cada um desses poços em duplicata recebeu um meio mais ácido 48 h.p.i (o meio TC-100 com soro pH 6.2 foi substituído pelo mesmo meio com pH 5.0) e a fusão de membranas foi observada por microscopia óptica após 1 hora e após 16 horas.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos genes Env, NS1 e EnvNS1

O RNA viral de Dengue 1 foi obtido a partir de células de inseto (C6/36) previamente infectadas com um isolado desse vírus do DF e submetido a uma reação de RT-PCR conforme descrito em Material e Métodos e utilizando oligonucleotídeos específicos para o isolamento dos genes de interesse. A avaliação dos produtos de RT-PCR revelou a amplificação de três regiões diferentes de acordo com tamanhos já esperados: região do gene **NS1** de 1.055 pb (oligonucleotídeos **NS1 PVX For** e **NS1 PVX Rev**) (Figura 14a.); região do gene do envelope (**Env**) (oligonucleotídeos **E PVX AscI For** e **E PVX Sall Rev** (tabela 1) de 1.500 pb e região conjunta desses dois genes, envelope e NS1 (**EnvNS1**) (oligonucleotídeos **E PVX AscI For** e **NS1 PVX Rev**) de 2.500 pb (Figura 12).

4.2. Clonagem e seqüenciamento de Env, NS1 e EnvNS1

Os fragmentos amplificados para os genes Env, NS1 e EnvNS1 de Dengue 1 (1.055, 1.500 e 2500 pb, respectivamente) foram clonados no plasmídeo pGEM-T easy. Os três plasmídeos obtidos após a transformação de células competentes (**DE**, **DNS1** e **DENS1**) foram avaliados em eletroforese em gel de agarose na forma intacta e na forma digerida com a enzima *Not I*, que promoveu a liberação dos insertos de interesse (Figura 13).

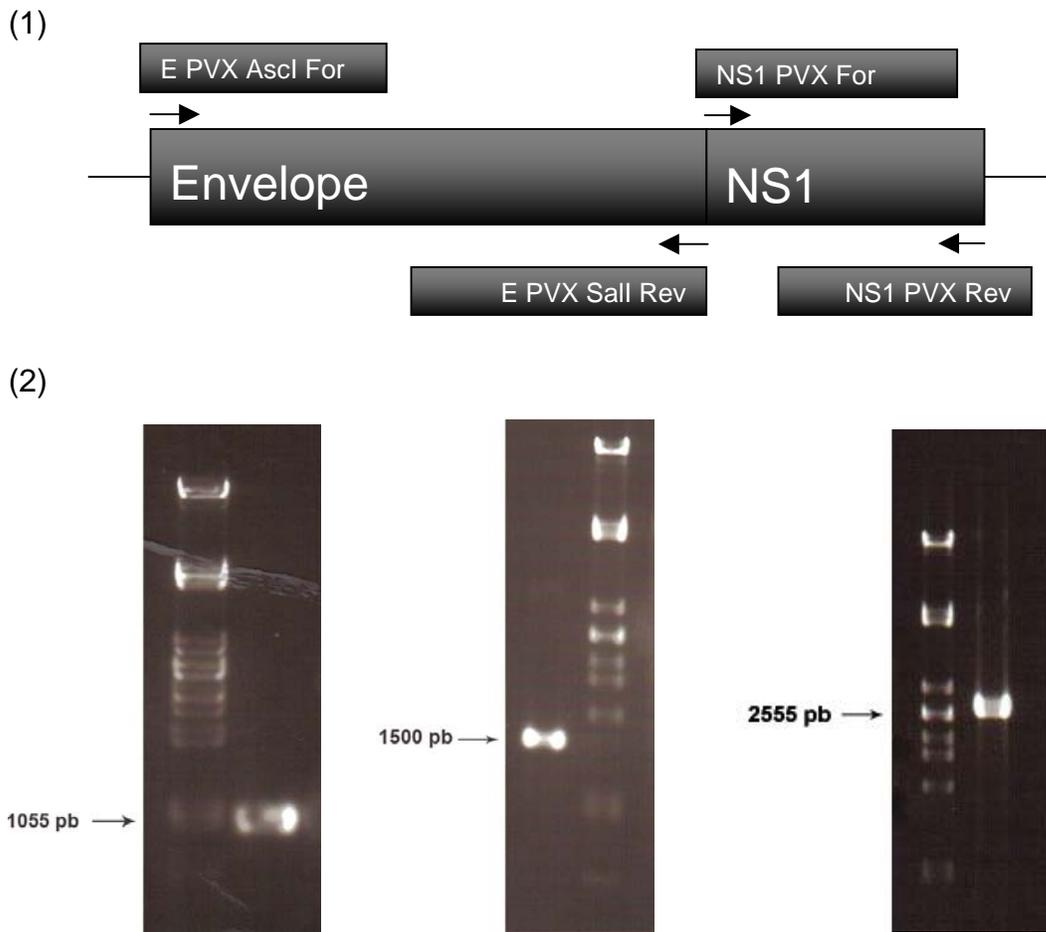


Figura 12: Obtenção dos genes do envelope (Env), NS1 (NS1) e Envelope e NS1 juntos (EnvNS1); **(1)** Esquema da posição dos oligonucleotídeos nos genes do envelope e NS1. **(2) A)** Gene NS1: eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o produto de amplificação do RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos NS1 PVX For e NS1 PVX Rev (Poço 2) e marcador DNA do fago lambda cortado com *Pst* I (Poço 1). A seta indica o fragmento de 1.055 pb referente ao tamanho do gene NS1.; **B)** Gene Env: eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o produto de amplificação do RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos E PVX AscI For e E PVX Sall Rev (Poço 1) e marcador DNA do fago lambda cortado com *Pst* I (Poço 2). A seta indica o fragmento de 1.500 pb referente ao tamanho do gene Env; **C)** Genes EnvNS1: eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o produto de amplificação do RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos E PVX AscI For e NS1 PVX Rev (Poço 2) e marcador DNA do fago lambda cortado com *Pst* I (Poço 1). A seta indica o fragmento de 2.555 pb referente ao tamanho dos genes EnvNS1.

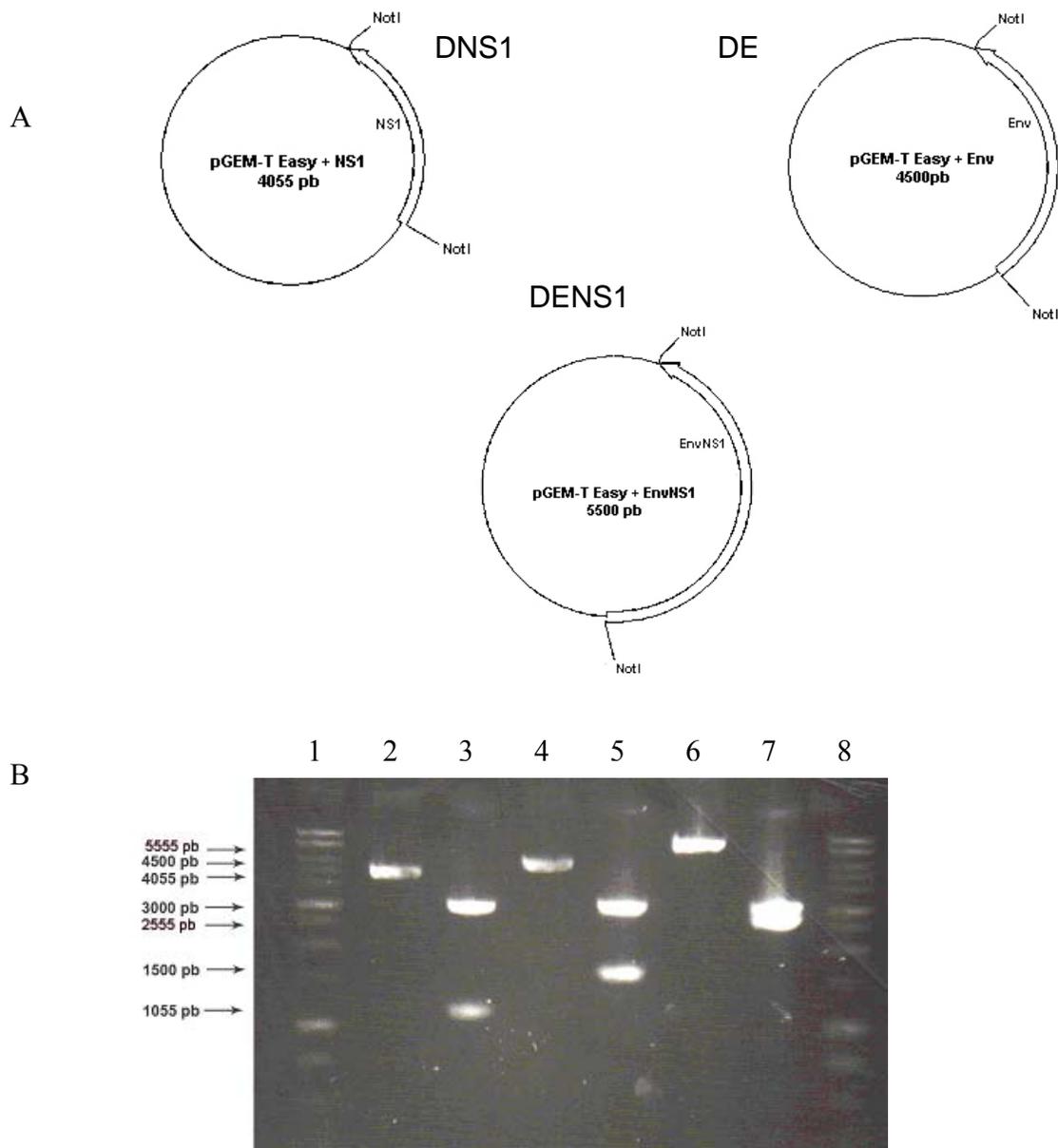


Figura 13: A) Esquema mostrando os plasmídeos DNS1 , DE e DENS1. O tamanho que cada plasmídeo possui em pares de bases (pb) é descrito na figura, bem como a posição da enzima *Not I* pois ela foi utilizada para clonagem dos genes em outros plasmídeos. Os plasmídeos DE, DNS1 e DENS1 foram derivados do pGEM-T Easy e possuem, respectivamente, os genes do envelope, NS1 e envelope fusionado ao NS1 do vírus da dengue. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Poços 2, 4 e 6: tamanho dos plasmídeos intactos; 5555 pb (DENS1), 4500 pb(DE), 4055 pb (DNS1). Poços 3, 5 e 7: tamanho dos plasmídeos digeridos com *Not I*; 3000 pb para o plasmídeo pGEM-T easy e 1055 pb (NS1), 1500 pb (DE) e 2555 pb (DENS1) dos insertos liberados. Poços 1 e 8: marcador de peso molecular.

Os clones foram seqüenciados (Figura 14) e a análise da seqüência mostrou que os clones DNS1 e DENS1 possuíam a seqüência correta. Entretanto, o clone DE, possuía um inserção de base adenina na posição 110 pb do gene do envelope, a qual resultou no aparecimento de um códon de parada prematuro.

4.3. Obtenção dos vetores pFastDE e pFastDENS1

Para a clonagem dos genes Env e EnvNS1 no vetor pFastBac1, os plasmídeos DE e DENS1 foram digeridos com *Not* I e os fragmentos de 1.500 e 2.500 pb foram ligados ao vetor pFastBac1, previamente digerido com a mesma enzima e desfosforilado formando dois novos plasmídeos denominados pFastDE (Env) e pFastDENS1 (EnvNS1). A construção desses dois plasmídeos pôde ser confirmada pela amplificação por PCR com oligonucleotídeos específicos para cada gene. No caso de pFastDE quando foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para o tamanho do gene do envelope (Env) - **E PVX AscI For** e **E PVX Sall Rev** - foi obtida como produto de amplificação uma banda de 1.500 pb condizente com o tamanho do envelope e, na confirmação da direção, foi obtida uma banda de 1.685 pb utilizando os primers **polHF** e **E PVX Sall Rev**, o que está de acordo com o tamanho esperado do gene do envelope mais o trecho do promotor da poliedrina, presente no plasmídeo pFastBac1 (Figura 15). Para o pFastDENS1, a confirmação da presença do inserto foi feita através de reação de PCR com os primers **E PVX AscI For** e **NS1 PVX Rev** e o produto de amplificação revelou uma banda de 2.555 pb, tamanho este esperado para os genes do envelope (1.500 pb) e NS1 (1.055 pb) juntos.

E PVX Ascl For


906 ttgctgatgctggtgacacccatcaatggccatgcgatgcggtggga
M R C V G

951 ataggcaacagagacttcgtcgaaggactgtcaggagcaacgtgg
I G N R D F V E G L S G A T W

996 gtagacgtggattggagcatggaagctgctgaccaccatggca
V D V V L E H G S C V T T M A

1041 aaaaataaaccaacattggacattgaactcttgaagacggaggtc
K N K P T L D I E L L K T E V

1086 acgaaccctgccgtcttgcgcaaactgtgcattgaagccaaaata
T N P A V L R K L C I E A K I

1131 tcaaacaccaccaccgattcaagatgtccaacacaaggagaggct
S N T T T D S R C P T Q G E A

1176 aacttggtggaagaacaagacgcgaactttgtgtgctgccgaacg
T L V E E Q D A N F V C R R T

1221 tttgtggacagaggctggggtaatggctgctgattattcggaaaa
F V D R G W G N G C G L F G K

1266 ggaagcctattgacgtgtgccaagttcaagtgtgtgacaaaacta
G S L L T C A K F K C V T K L

1311 gaaggaagatagttcaatatgaaaacttaaaatattcagtgata
E G K I V Q Y E N L K Y S V I

1356 gtcaccgtccacactggggatcagcaccagggtgggaaacgagact
V T V H T G D Q H Q V G N E T

1401 acagaacatggaacaattgcaaccataaacacctcaagctcccacg
T E H G T I A T I T P Q A P T

1446 tcggaatacagctgactgactacggagccctcacattggactgt
S E I Q L T D Y G A L T L D C

1491 tcacctagaacagggctggactttaatgagatgggtgctattgaca
S P R T G L D F N E M V L L T

1536 atgaaagaaaaatcatggcttgtccacaaacaatggtttctagac
M K E K S W L V H K Q W F L D

1581 ttaccactgccttggacttcggggcttcaacatcccaagagact
L P L P W T S G A S T S Q E T

1626 tggaaacagacaagatttgcgtggtcacattcaagacagctcatgca
W N R Q D L L V T F K T A H A

1671 aagaaacaggaagtagtctgactgggatcacaagaaggagcaatg
K K Q E V V V L G S Q E G A M

1716 **cacaccgcttgactggggcgacagaaatccagacgtcaggaacg**
H T A L T G A T E I Q T S G T

1761 **acaacaatccttgcagggcacctgaaatgcagactaaaaatggat**
T T I F A G H L K C R L K M D

1806 **aaactgactttaaggggacgtcatatgtgatgtgcacaggetca**
K L T L K G T S Y V M C T G S

1851 **tttaagctagagaaggaagtggctgagaccagcatggaactggt**
F K L E K E V A E T Q H G T V

1896 **ctagtgcaggtcaaatacgaaggaacagatgcgccatgcaagatc**
L V Q V K Y E G T D A P C K I

1941 **cccttttcgacccaagatgagaaaggagtgaccagaatgggaga**
P F S T Q D E K G V T Q N G R

1986 **ttgataacagccaatcccatagttactgacaaagaaaaaccagtc**
L I T A N P I V T D K E K P V

2031 **aacattgagacagaaccaccttttggtgagagctacatcgtggta**
N I E T E P P F G E S Y I V V

2076 **ggggcaggtgaaaaagctttgaaactaagctggttcaagaaagga**
G A G E K A L K L S W F K K G

2121 **agcagcatagggaaaaatgttcgaagcaaccgcccaggagcacga**
S S I G K M F E A T A R G A R

RTENVDI


2166 **aggatggctatcctggga**gacaccgcatgggaactttggtctctata****
R M A I L G D T A W D F G S I

2211 **ggaaggagtgttcacatctgtgggaaaattggtacaccaggttttt**
G G V F T S V G K L V H Q V F

2256 **ggaaccgcatatgggtgttcgttcagcgggttttctggaccatg**
G T A Y G V L F S G V S W T M

2301 **aaaataggaatagggattctgctgacatggttgggattaaattca**
K I G I G I L L T W L G L N S

2346 **aggagcacgtcactttcgatgacgtgcattgcagttggcatggtt**
R S T S L S M T C I A V G M V

NSI PVX For


2391 **acactgtacctaggagt**catggttcaagc****gactcgggatgtgta****
T L Y L G V M V Q A D S G C V

E PVX Sall Rev


2436 **atcaa**ctggaagggcagagaactcaaatgtggaagtggcattttt
I N W K G R E L K C G S G I F

2481 **gtcactaatgaagtccacacttggacagagcaatacaaatccag**

V T N E V H T W T E Q Y K F Q

2526 gctgactccccaaaaagactgtcagcagccattggaaaggcatgg
A D S P K R L S A A I G K A W

2571 gaggagggcgtgtgtggaattcgatcagccacgcgtcttgagaac
E E G V C G I R S A T R L E N

2616 atcatgtggaagcaaataatcaaataatgaaccacattctactt
I M W K Q I S N E L N H I L L

2661 gaaaaatgacatgaaattcacagtgggtgtaggagatgctaaggaa
E N D M K F T V V V G D A N G

2706 attttggcccaagggaataatgattaggccacaacccatggaa
I L A Q G K K M I R P Q P M E

2751 cacaaatactcatggaaaagctggggaaaagctaaaatcatagga
H K Y S W K S W G K A K I I G

2796 gcagacatacaaaaataccaccttcatcatcgacggcccagatact
A D I Q N T T F I I D G P D T

2841 ccagaatgccccgatgaacaaagagcgtggaacatttgggaagtt
P E C P D E Q R A W N I W E V

2886 gaggactatgggtttggaattttcacgacaaacatatggctgaaa
E D Y G F G I F T T N I W L K

2931 ttgctgactcctacacccaaatgtgtgaccaccggctaagtgtca
L R D S Y T Q M C D H R L M S

2976 gctgccatcaaggacagcaaggcagtcctatgctgacatgggggtac
A A I K D S K A V H A D M G Y

3021 tggatagaaagtgaaaagaacgaaacctggaagctggcgagagcc
W I E S E K N E T W K L A R A

3066 tccttcatagaagtcaagacatgcatctggccgaaatcccacact
S F I E V K T C I W P K S H T

3111 ctatggagtaatggagttttggaaagtgaaatgataatcccaaag
L W S N G V L E S E M I I P K

3156 atatatggaggaccaataatctcagcacaactacagaccagggtat
I Y G G P I S Q H N Y R P G Y

3201 ttcacacaaacagcagggccatggcacctaggcaagttggaattg
F T Q T A G P W H L G K L E L

RTNSID1



3246 gattttgacttgtgtgaaggcaccacagttgttggatgaacat
D F D L C E G T T V V V D E H

3291 tgtggaaatcgaggtccatctctcagaactacaacagtcacagga
C G N R G P S L R T T T V T G

```

3336 aagataatccatgaatgggtgttgagatcctgcacgctaccccc
      K I I H E W C C R S C T L P P
3381 ttacggttcagaggagaagacggatgttggtatggcatggaaatc
      L R F R G E D G C W Y G M E I
3426 agaccagttaaggagaaggaggagaacctagtaggtcaatggtc
      R P V K E K E E N L V R S M V
NS1 PVX Rev
      ←
3471 tctgcagggtcaggagaagtggacagtttt 3500
      S A G S G E V D S F

```

Figura 14.: Sequência gênica da região dos genes do envelope e NS1 do vírus da dengue sorotipo 1 isolado no Distrito Federal (Carvalho *et alli.*, 2005). Bases realçadas em verde: Gene do envelope (nucleotídeos 935-2419 no genoma de Dengue; Bases realçadas em amarelo: Gene NS1 (nucleotídeos 2420-3475). A partir dessa seqüência foram desenhados os oligonucleotídeos **E PVX AscI For**, **E PVX SalI Rev** e **RTENV1D1** (indicados em vermelho) e **NS1 PVX For**, **NS1 PVX Rev** e **RTNS1D1** (indicados em azul). Seta laranja: inserção de base adenina na posição 110 pb do gene do envelope.

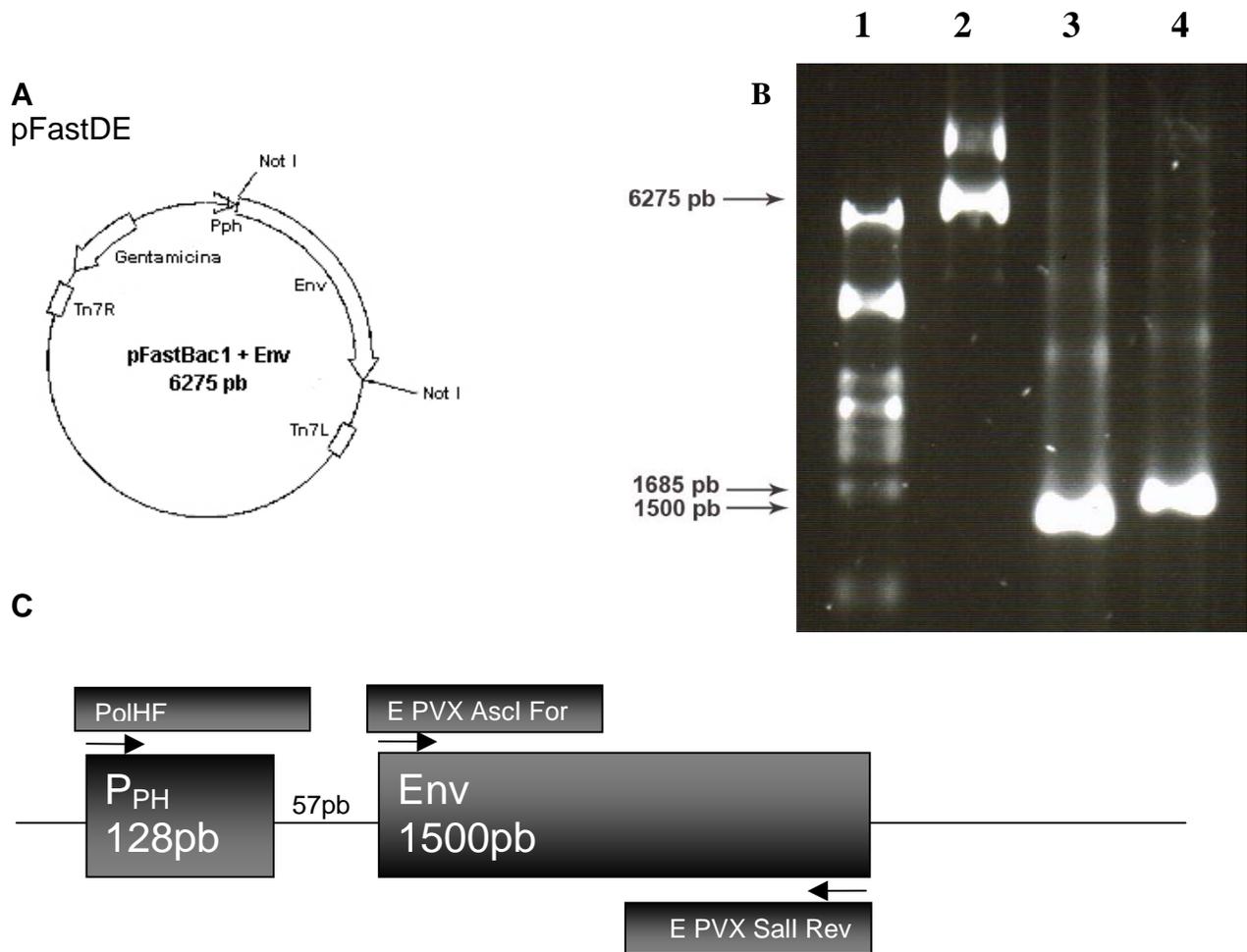


Figura 15: Clonagem do gene do envelope no plasmídeo pFastBac1. **A)** Esquema mostrando o plasmídeo pFastDE. O tamanho do plasmídeo em pares de bases (pb) é descrito na figura, bem como a posição da enzima *Not I* que foi utilizada para clonagem dos genes do envelope e NS1. Além disso, o plasmídeo mostra a posição e orientação de genes de resistência aos antibióticos gentamicina, promotor do gene da poliedrina (P_{PH}) e regiões esquerda (Tn7L) e direita (Tn7R) do transposon Tn7 de *E. coli*. **B)** Fotografia de um gel de agarose 0,8% com amostras de PCR de pFastDE. Poço 1: Marcador de massa molecular (DNA do fago lambda cortado com *Pst I*). Poço 2: miniprep do plasmídeo intacto (6.275 pb); Poço 3: Produto de PCR amplificado o gene do envelope através da utilização dos oligonucleotídeos E PVX SalI Rev e E PVX Asc I For (1.500 pb); Poço 4: Produto de PCR amplificando o gene do envelope através da utilização dos oligonucleotídeos E PVX SalI Rev e pPoIHF (1.685 pb); **C)** Esquema mostrando a posição de anelamento dos oligonucleotídeos pPoIHF e E PVX Sal I Rev no plasmídeo pFastDE.

Na confirmação da direção, uma reação de PCR foi realizada com os oligonucleotídeos **polHF** e **E PVX Sall Rev** (amplificando parte do inserto, 1.500 pb, mais o promotor da poliedrina) (Figura 16).

4.4. Obtenção dos bacmídeos recombinantes BacDE e BacDENS1

Os plasmídeos pFastDE e pFastDENS1 foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* (DH10-Bac, Invitrogen) competentes e, através de um evento de transposição, os insertos foram transferidos do plasmídeo para o genoma de um baculovírus presente na forma plasmidial (bacmídeo) dentro dessa bactéria. A transposição pôde ser confirmada com a realização de uma reação de PCR recomendada pelo fabricante. A reação de PCR utilizando 1 µL do DNA do bacmídeo recombinante (100 ng) BacDE amplificou um fragmento de aproximadamente 2.150 pb conforme esperado (Figura 17) quando os oligonucleotídeos **M13** reverso e **E PVX AscI For** foram utilizados. Já a reação de PCR utilizando 1 µL do DNA do bacmídeo recombinante (100 ng) de BacDENS1 amplificou um fragmento de aproximadamente 3.150 pb também conforme o esperado (Figura 17) quando os mesmos oligonucleotídeos, **M13** reverso e **E PVX AscI For**, foram utilizados.

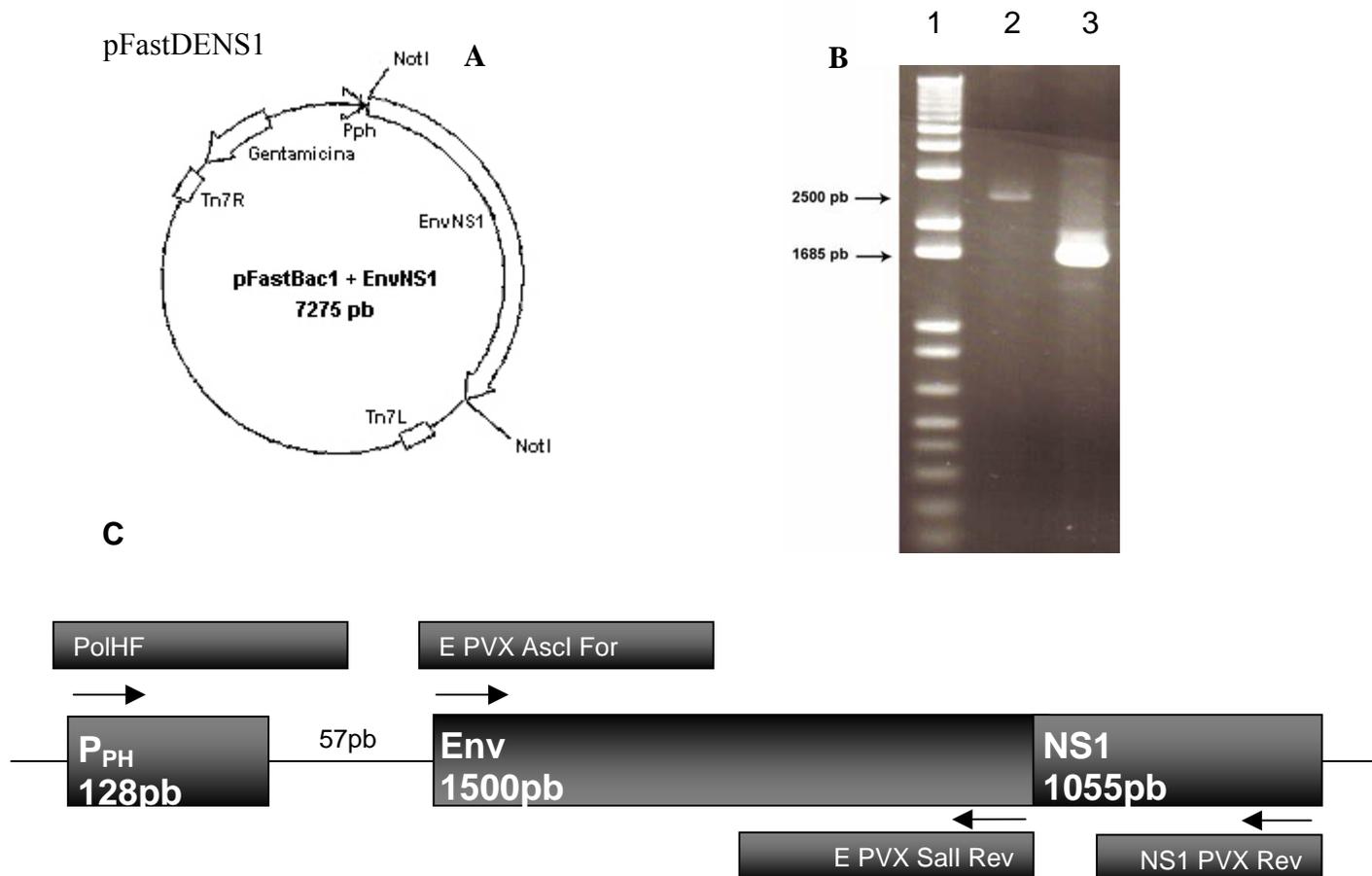


Figura 16: Clonagem do gene do EnvNS1 no plasmídeo pFastBac1. **A)** Esquema mostrando o plasmídeo pFastDENS1. O tamanho do plasmídeo em pares de bases (pb) é descrito na figura, bem como a posição da enzima *Not* I que foi utilizada para clonagem dos genes do envelope e NS1. Além disso, o plasmídeo mostra a posição e orientação de genes de resistência aos antibióticos gentamicina, promotor do gene da poliedrina (P_{PH}) e regiões esquerda (Tn7L) e direita (Tn7R) do transposon Tn7 de *E. coli*. **B)** Fotografia de um gel de agarose 0,8% com amostras de PCR de pFastDENS1. Poço 1: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA ladder). Poço 2: produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos E PVX AscI For e NS1 PVX Rev, obtendo como produto de amplificação uma banda de 2.500 pb condizente com o tamanho do envelope e NS1. No poço 3 a confirmação da direção obtida por PCR com os oligonucleotídeos **polHF** e **E PVX Sal I Rev**; **(C)** Esquema mostrando a posição de anelamento dos oligonucleotídeos polHF, E PVX Sal I Rev e NS1 PVX Rev no plasmídeo pFastDENS1.

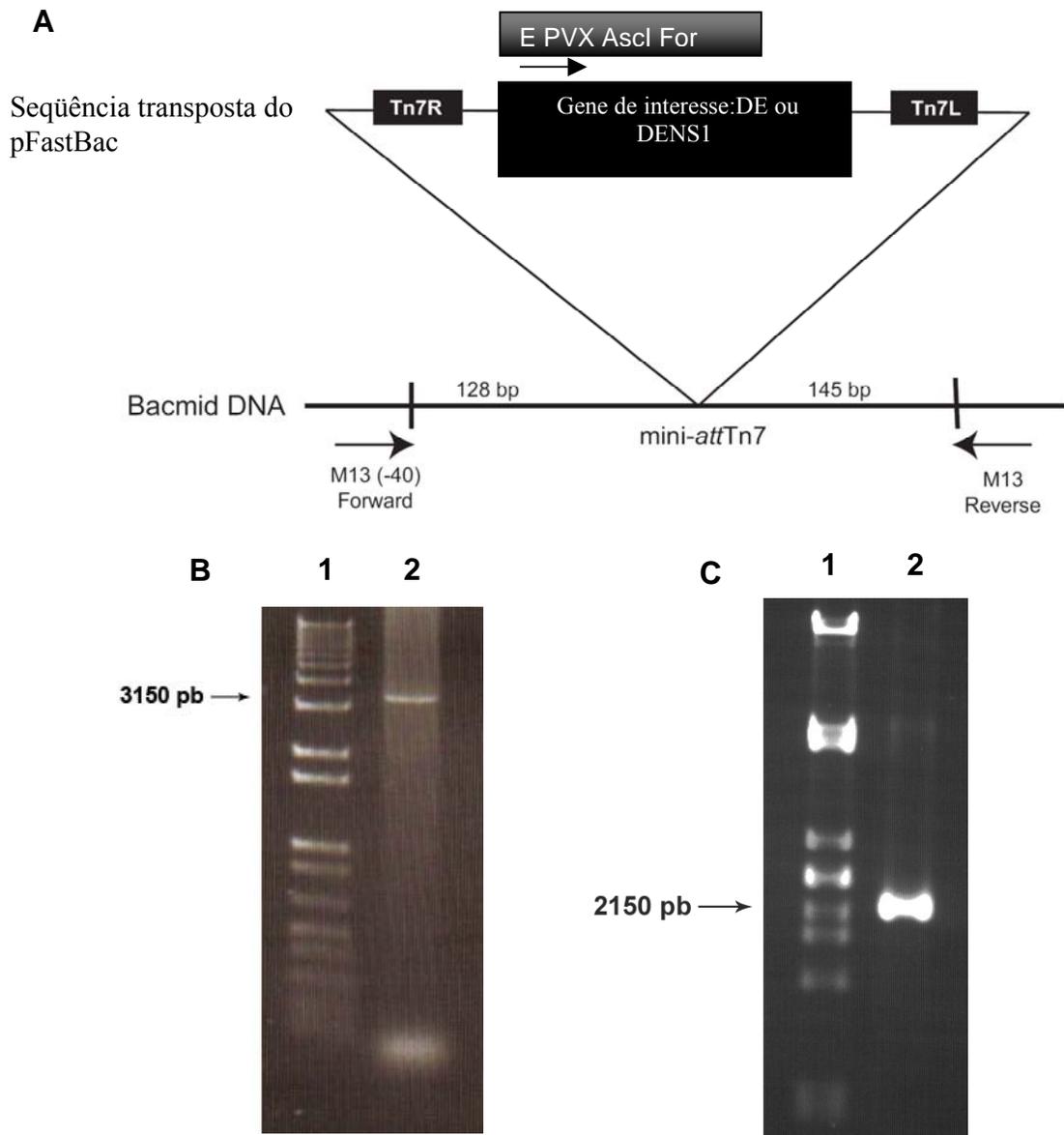


Figura 17: Confirmação da transposição dos genes de interesse (Env e EnvNS1) para o DNA do bacmídeo.

A) Esquema mostrando a organização do bacmídeo, dos insertos de interesse, dos primers M13 e da região de transposição. (B) Gel de agarose 0,8%. Poço 1: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA ladder); Poço 2: BacDENS1, produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos M13 reverso e E PVX AscI For obtendo a banda esperada de 3.150 pb. (C) Gel de agarose 0,8%. Poço 1: Marcador de peso molecular (fágo lambda digerido com *Pst* I); Poço 2: BacDE, produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos M13 reverso e E PVX AscI For obtendo a banda esperada de 2.150 pb.

4.5. Análise transcricional do genes Env e EnvNS1 expressos em células de inseto

Um micrograma de DNA do bacmídeo BacDE foi utilizado na transfecção em células *Trichoplusia ni* (TN5B) para obtenção do vírus recombinante vAcDE. O mesmo foi feito com um micrograma de DNA do bacmídeo BacDENS1 que, uma vez transfectado em células de inseto, deu origem ao vírus vAcDENS1.

O RNA viral purificado, a partir de 5×10^6 células infectadas com o vírus vAcDE ou infectadas com vAcDENS1, foi submetido a uma reação de RT-PCR para confirmação da transcrição dos genes Env e EnvNS1 (respectivamente). O oligonucleotídeo T1 foi utilizado na confecção do cDNA e o primer T2 foi utilizado na reação de PCR como primer Reverso. Os primers "forward" variaram quanto ao interesse: o RT-PCR de vAcDE utilizou o oligonucleotídeo **E PVX AscI For**, obtendo um fragmento de 1600 pb (Figura 18); já o RT-PCR de vAcDENS1 utilizou o oligonucleotídeo **RTENV1**, obtendo um produto de amplificação de 1394 pb ou o oligonucleotídeo **RTNS1D1** obtendo fragmentos maiores que 500 pb (Figura 19). Para a confirmação da amplificação do transcrito, os RT-PCR de BacDENS1 foram precipitados e submetidos à análise de restrição com a enzima *Not I*, gerando novos fragmentos correspondentes apenas aos fragmentos de gene, a partir do oligonucleotídeo "forward", sem o tamanho da cauda poli-A.

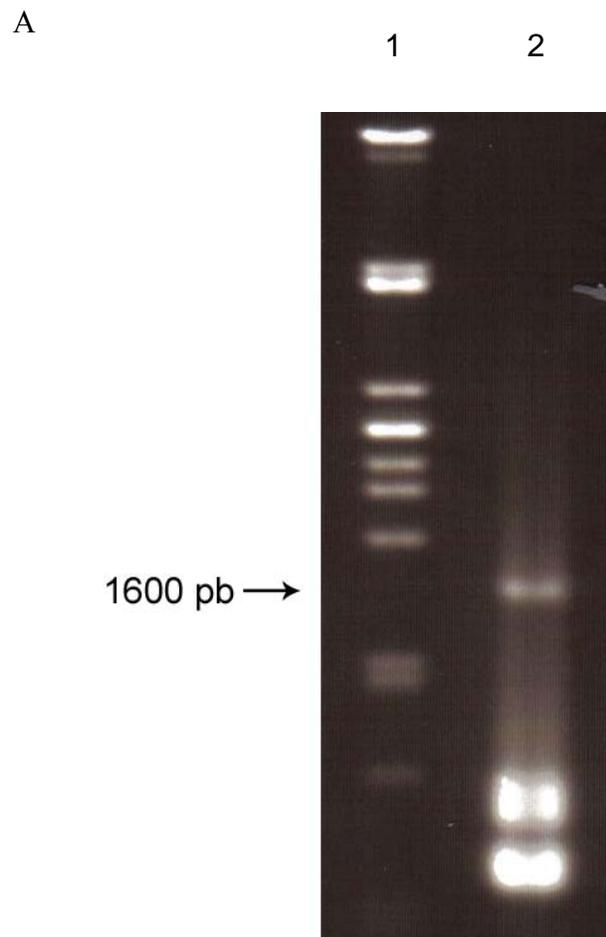


Figura 18: Análise transcricional de células TN5B infectadas com vAcDE. Gel de agarose 0,8 %. Poço 1: marcador de peso molecular (fago lambda digerido com *Pst* I); Poço 2: Produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos E PVX AscI For e T2, obtendo um fragmento de 1.600 pb.

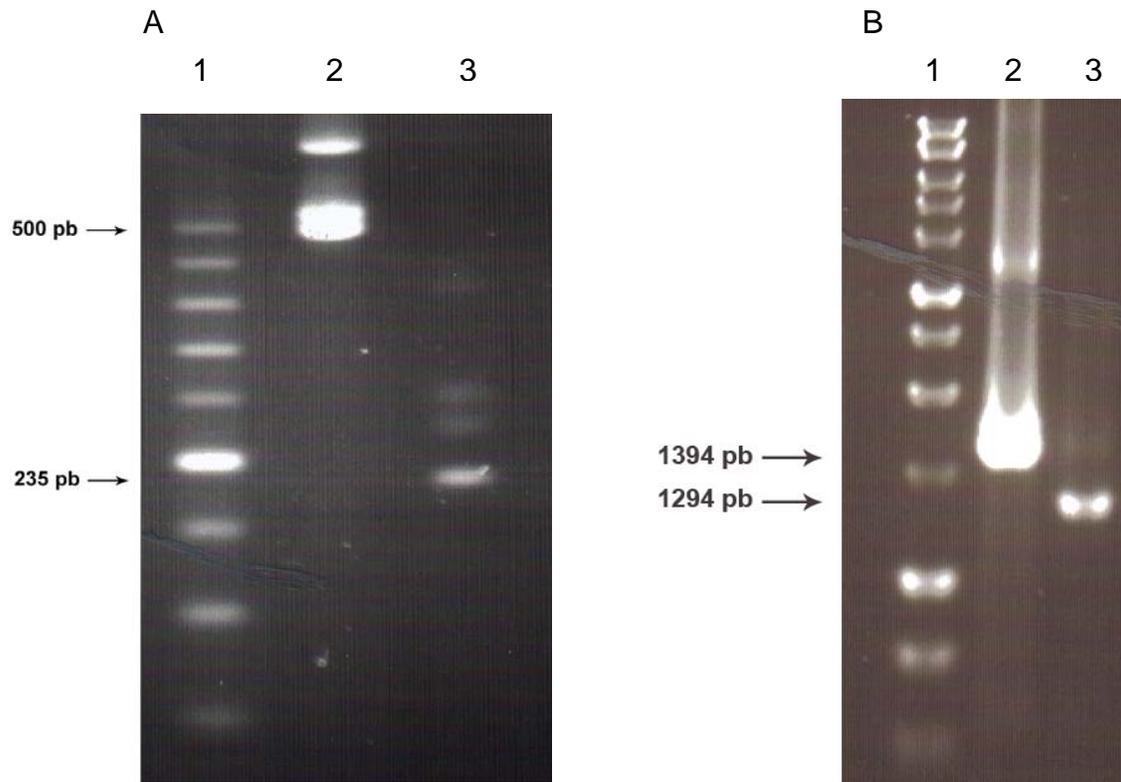


Figura 19: Análise transcricional de células TN5B infectadas com vAcDENS1. A) Gel de agarose 2 %. Poço 1: marcador de peso molecular (50pb DNA ladder); Poço 2: Produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos RTNS1D1 e T2, obtendo três fragmentos acima de 500 pb; Poço 3: Os mesmos produtos de PCR digerido com *Not* I obtendo um fragmento principal de 235 pb. B) Gel de agarose 0,8 %. Poço 1: marcador de peso molecular (1Kb DNA ladder); Poço 2: Produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos RTENVD1 e T2, obtendo mais de um fragmento; Poço 3: O mesmo produto de PCR digerido com *Not* I obtendo um fragmento principal de 1.294pb.

4.6. Análise da expressão da proteína ENV e da proteína ENVNS1 em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Imuno-deteccção (Western-blot)

Os vírus vAcDE e vAcDENS1 foram usados para infectar Larvas de *Spodoptera frugiperda* no terceiro ou quarto instar e, 72 h.p.i., as lagartas foram colocadas no gelo e posteriormente abertas para retirada do tecido adiposo. Esse tecido adiposo foi utilizado para análise da expressão das proteínas ENV e ENVNS1 em dois géis desnaturantes de poliacrilamida SDS-PAGE a 12% para cada análise de expressão. Foram analisados, também, extrato de células controle (TN5B) não infectadas, extrato de larvas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus recombinante vSynBtCry1Ab (contendo o gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*) e o extrato de larvas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus vSynBtCry11 (contendo o gene *cry11* de *Bacillus thuringiensis*). De cada dois géis em duplicata, um gel foi corado e fixado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético e Coomassie blue e o outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose para o experimento de imuno-deteccção. A membrana foi marcada com anticorpo anti-Dengue. A imunomarcação com o anticorpo anti-Dengue foi capaz de detectar uma banda correspondente a 70 kDa (Figura 20) na amostra correspondente ao extrato de células infectadas com o vírus vAcDE e uma banda de 70 kDa também, correspondente ao extrato de larvas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus vAcDENS1. (Figura 21)

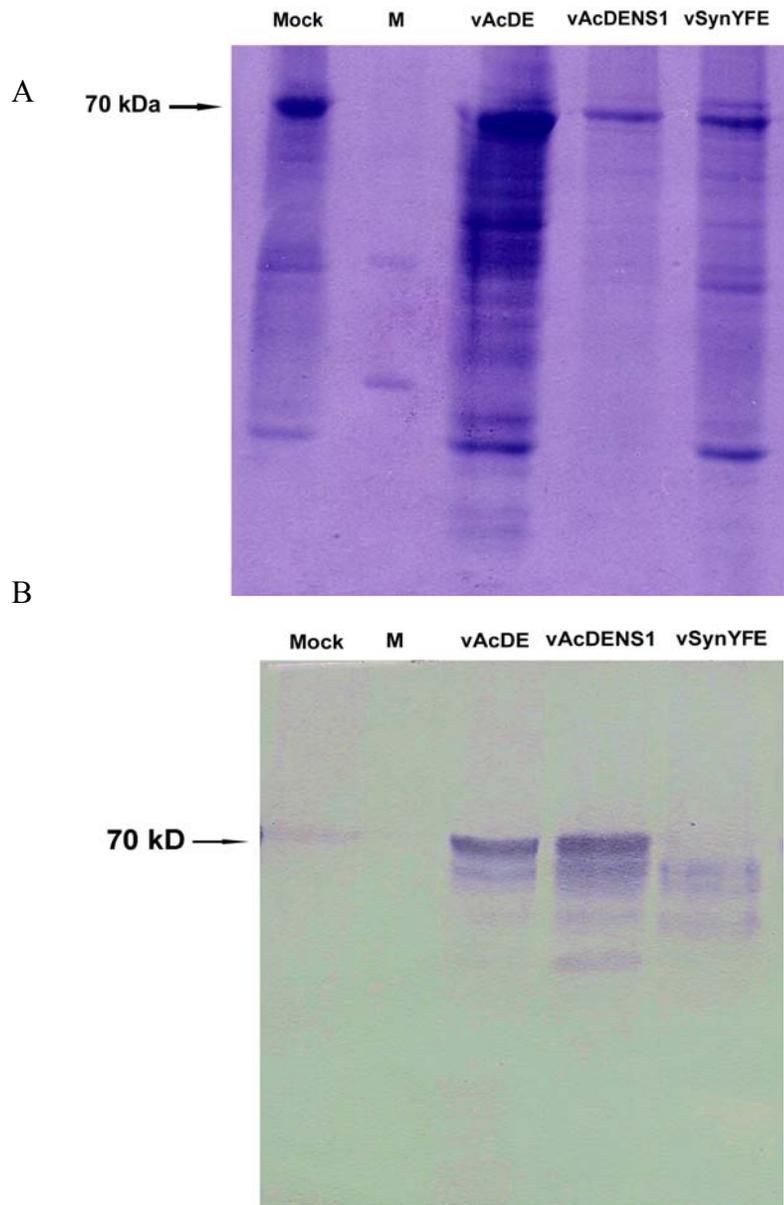


Figura 20: SDS PAGE e Imuno-marcação de extratos do tecido adiposo de *Spodoptera frugiperda* infectada com o vírus vAcDE. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1: Extrato de tecido adiposo de larvas mock (não infectadas); Poço 2: Marcador de massa molecular (Mo Bi Tec®); Poço 3: Extrato de tecido adiposo de larvas infectadas com o vírus vAcDE; Poço 4: Extrato de tecido adiposo de larvas infectadas com o vírus vAcDENS1; Extrato de tecido adiposo de larvas infectadas com o vírus vSynYFE (um baculovírus recombinante que possui o gene do envelope do vírus da Febre Amarela) gentilmente cedido por Tatiane Guerreiro Campanhoni Machado. A seta indica a banda de aproximadamente 70 kDa marcada em B. B) Membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo anti-Dengue. A ordem das amostras nos poços 1, 2, 3, 4, e 5 é igual ao que foi descrito para A. A seta indica a marcação por anticorpo na altura de 70 kDa.

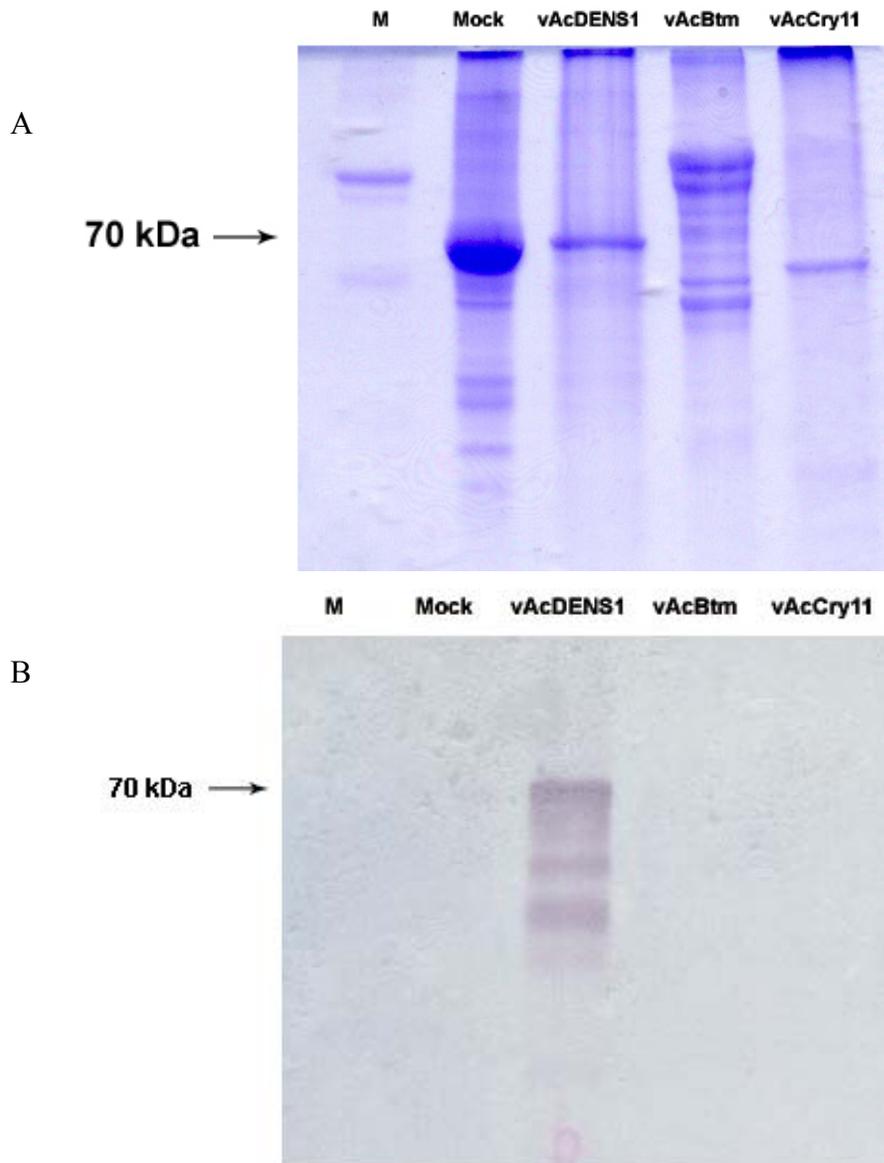


Figura 21: SDS PAGE e imuno-marcação de extratos do tecido adiposo de *Spodoptera frugiperda* infectada com vAcDENS1. A) Gel de poliacrilamida desnaturante 12%. Poço 1: Marcador de massa molecular (Mo Bi Tec®); Poço 2: Extrato de tecido adiposo de larvas mock (não infectadas); Poço 3: Extrato de tecido adiposo de larvas infectadas com o vírus vAcDENS1; Poço 4: Extrato de tecido adiposo de larvas infectadas com o vírus recombinante vAcBtm (contendo o gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*); Poço 5: Extrato de tecido adiposo de larvas infectadas com o vírus recombinante vAcCry11 (contendo o gene *cry1I* de *Bacillus thuringiensis*). Os extratos dos poços 4 e 5 foram gentilmente cedidos por Gláucia Lima. A seta indica a banda de 70 kDa marcada em B. B) Membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo anti-Dengue. A ordem das amostras nos poços 1, 2, 3, 4, e 5 é igual ao que foi descrito para A. A seta indica a marcação por anticorpo na altura de 70 kDa.

4.7. Construção do vetor de célula estável contendo o gene NS1

O fragmento do gene NS1 (1.055 pb), contendo os sítios de *Eco* RI nas extremidades foi clonado no plasmídeo pGEM HSP70 previamente digerido com *Eco* RI. A ligação foi confirmada através de reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos **NS1 PVX Rev** e **SP6**. O produto amplificado deu origem a uma banda já esperada de 1.790 pb, dando origem ao plasmídeo pGemHSP70NS1. (Figura 22).

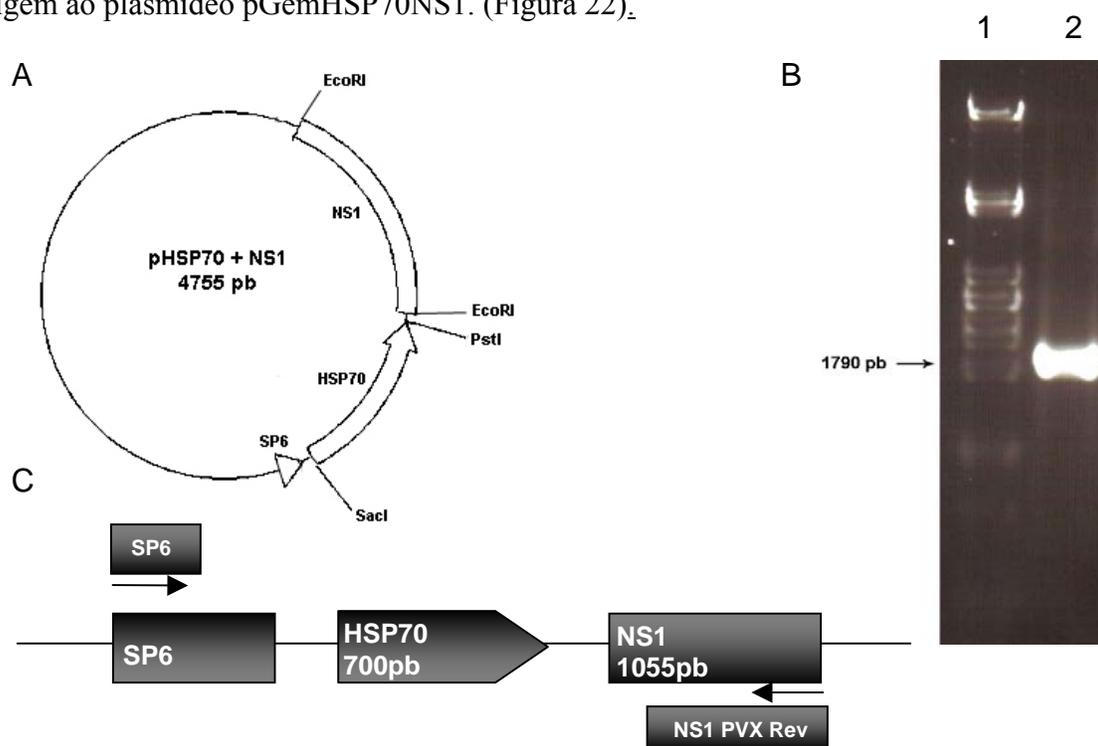


Figura 22: Confirmação da clonagem de NS1 em pGEM HSP 70. A) Esquema do plasmídeo pGEM HSP70 NS1, mostrando o gene NS1 de Dengue I sob o controle do promotor *hsp70* de *D. melanogaster*, presente entre os sítios de *Pst* I e *Sac* I do plasmídeo pGEM-T. B) Gel de agarose 0,8%. Poço 1: Marcador de massa molecular (fago lambda digerido com *Pst* I); Poço 2: Produto de PCR utilizando os nucleotídeos NS1 PVX Rev e SP6 e confirmando a inserção de NS1 pela banda de 1.790 pb (indicada pela seta). O tamanho corresponde ao gene NS1 (1.055 pb) adicionado da região do plasmídeo até SP6, incluindo o promotor *hsp 70* de 700 pb. C) Esquema de anelamento dos oligonucleotídeos.

4.8. Ensaio de fusão

Um ensaio de fusão para determinar se as proteínas recombinantes de Dengue 1 provocam uma maior fusão de membranas nas células infectadas (TN5B) quando essas são colocadas em um meio ácido foi realizado tendo por base de comparação células mock TN5B não infectadas e células TN5B infectadas com o vírus vSynGal. As células receberam o meio ácido 48 h.p.i. e foram observadas por microscopia óptica 1 hora após adição do meio ácido e 16 horas depois. As células mock não apresentaram células fusionadas; células infectadas por vSynGal apresentaram fusão de membrana, o que é devido à ação da proteína gp64 do baculovírus segundo Blissard & Wenz, 1992. Células infectadas por vAcDENS1 apresentaram maior capacidade de fusão de membranas, de modo muito mais claro, quando comparado com a quantidade de fusão de membranas de células com vSynGal, o que ficou muito mais evidente na avaliação de 16 h após a adição do meio ácido (Figura 23).

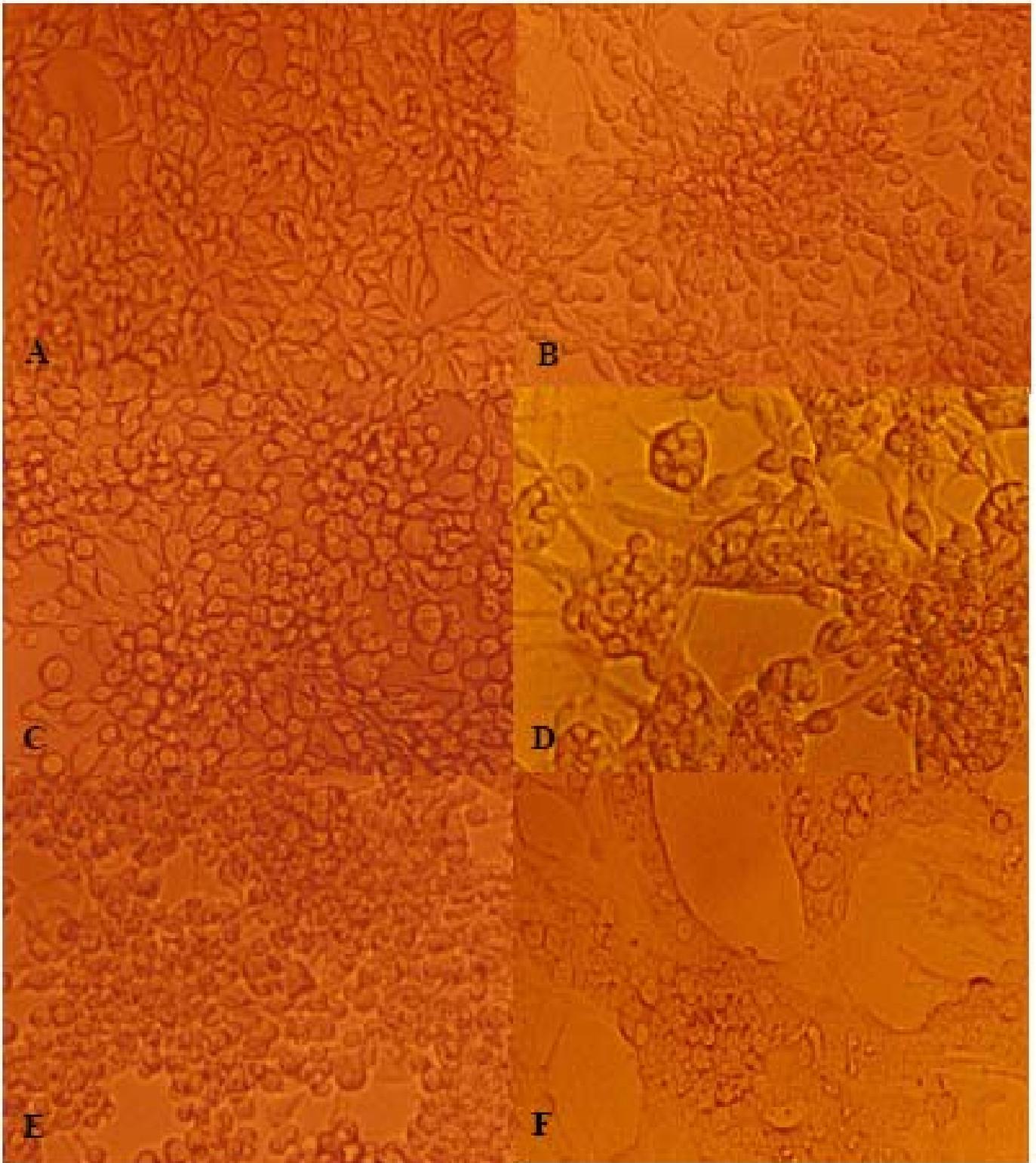


Figura 23: Células de inseto TN5B infectadas com 2 diferentes baculovirus em um ensaio de fusão de membrana. (A) e (B): células TN5B não infectadas (mock); (C) e (D): células TN5B infectadas (64 h p.i.) com vSynVI-Gal. (E) e (F): células TN5B infectadas (64 h p.i.) com vAcDENS1. Em A, C e E, as células foram mantidas em meio TC-100 + pH 6,2; Em B, as células foram mantidas em meio TC-100 + pH 6,2 por 48 h.e após esse período mantidas por 16 h em meio TC-100 + pH 5,0; Em D e F, o meio TC-100 + pH 6,2 foi substituído por meio TC-100+ pH 5,0 e as células mantidas a 27°C por 16 h..

5. DISCUSSÃO

O uso de proteínas recombinantes na ativação de resposta imunológica em vacinas ou como antígenos em testes diagnósticos vem se tornando bastante comum por se tratar de uma alternativa atraente quando comparada aos métodos tradicionais. Novos mecanismos de vacinação vêm sendo estudados e a tendência é que as vacinas do futuro não possuam, em sua composição, o agente etiológico atenuado ou inativado, mas apenas partes deste agente como estimuladores da resposta imunológica e proteção do indivíduo à infecção. Este já é o caso da vacina que previne a infecção pelo vírus da Hepatite B que é composta apenas do antígeno HBsAg presente na fase aguda da doença, conforme descrito por Mahoney (1999). Com relação aos métodos diagnósticos, a grande vantagem encontra-se no uso das proteínas recombinantes em substituição às preparações dos agentes etiológicos, que sejam capazes de responder antigenicamente como o patógeno inteiro. Isso é especialmente importante no caso dos vírus, pois o preparado viral envolve grandes custos na inativação ou atenuação, risco de amplificar os vírus infectivos em culturas de células ou modelos animais e, conforme descrito por Marx *et alli.*, (2001), para o caso do diagnóstico do vírus TBE (Tick borne encephalitis), muitas vezes esses procedimentos só podem ser desenvolvidos em laboratórios com altos níveis de segurança o que é um entrave na obtenção de antígenos.

O sistema baculovírus de expressão em células de inseto vem sendo amplamente utilizado para expressar proteínas que funcionem como antígenos em testes diagnósticos. Estes testes diagnósticos podem ser utilizados na identificação de doenças humanas (como exemplo, a identificação sorológica do vírus Hantaan causador da hantavirose identificado

por um antígeno expresso em baculovírus conforme descrito por Morii *et alli.*, 1998) ou ainda no diagnóstico sorológico de doenças animais com potencial para infectar humanos (como é o caso da doença da estomatite vesicular de bovinos, cujo vírus é capaz de infectar humanos também, onde a proteína do nucleocapsídeo viral expressa em baculovírus é utilizada no diagnóstico de acordo com Ahmad *et alli.* 1993). Conforme descrito por Gut-Winiarska *et alli.*, 2000, a glicoproteína G de um vírus semelhante ao da Raiva que infecta suínos (pseudorabies vírus), que foi expressa através do sistema baculovírus, apresentou elevada atividade antigênica em uma reação de ELISA, podendo ser utilizada em kits diagnósticos. O uso dessa proteína recombinante traria como principal benefício a biossegurança com relação ao vírus, pois representaria apenas as características antigênicas deste sem o risco de infecção. As vantagens da utilização de proteínas recombinantes, expressas em células de inseto pela infecção com baculovírus recombinantes, estão na similaridade da proteína recombinante com a proteína nativa, expressa *in vivo*, e a possibilidade de criar testes mais rápidos e específicos, apresentando menos reações cruzadas quando comparados aos testes tradicionais.

Neste trabalho, o sistema baculovírus foi utilizado para expressar proteínas do vírus da Dengue em células de inseto. O gene não-estrutural 1 (NS1) e o gene do envelope (Env) foram isolados por RT-PCR de culturas de células C6/36 de *Aedes albopictus* previamente infectadas com um isolado do Distrito Federal do vírus Dengue 1 (Carvalho *et alli.*, 2005). Casos de Dengue importados de outros estados vêm sendo notificados no Distrito Federal desde 1991, mas em 2000, o vírus da Dengue sorotipo 1 foi isolado pela primeira vez de mosquitos *Aedes aegypti*, caracterizando casos autóctones (ou seja, casos não-importados de outros estados) (Dégallier *et alli.*, 2000). Além de Dengue 1, outros sorotipos de dengue já foram utilizados na expressão de proteínas recombinantes em células

de inseto, em especial Dengue 2 (Kelly *et alli*, 2000); por já ter sido o sorotipo mais prevalente nas Américas por um bom período de tempo (Silva *et alli.*, 2002). O primeiro isolamento de Dengue 3 no Brasil foi em 2001 e desde então este sorotipo tem se tornado mais prevalente do que o Dengue 2, o que acaba sendo refletido na escolha do sorotipo quando do isolamento dos genes de interesse para diagnóstico. A expressão combinada dos dois também vem sendo estudada, especialmente como um passo rumo ao objetivo final de uma vacina tetravalente para Dengue (Bielefeldt-Ohmann *et alli.*, 1997). O Dengue 4, apesar de menos comum, também vêm sendo escolhido no isolamento de proteínas antigenicamente importantes com o mesmo objetivo (Zhang *et alli.*, 1998).

Outras proteínas de Dengue além da do envelope e NS1 já foram expressas em células de inseto através da utilização de baculovírus, mas as proteínas do envelope e NS1 são as mais estudadas, o que é justificado pelo alto potencial antigênico e imunogênico dessas proteínas. A proteína do envelope apresenta uma grande homologia de seqüência entre os quatro diferentes sorotipos de dengue e é promissora por permitir a confecção de quimeras que induzam a produção de imunidade contra os quatro sorotipos de uma só vez (Zhang *et alli.*, 1988). Além disso, é a proteína do envelope a responsável pela entrada do vírus na célula, pela fusão de membranas e pela produção de anticorpos neutralizantes, caracterizando-se assim como uma proteína de alto poder antigênico e aplicabilidade para diagnóstico (Henchal & Putnak, 1990). A proteína NS1 pode ter um papel fundamental no desenvolvimento de Dengue hemorrágica (Zhao *et alli.*, 1987) e seu reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro está relacionado com a ativação do sistema complemento e lise da célula infectada (Falconar, 1997). Outras proteínas são descritas na literatura sendo expressas em baculovirus e avaliadas quanto ao uso potencial em diagnósticos e vacinas, como a proteína NS3 e pré-M (Feighny *et alli.*, 1992; Stephenson,

2005), mas os testes de imunização utilizando modelos animais de camundongos (Feighny *et alli.*, 1992) ou até de macacos rhesus (Eckels *et alli.*, 1994) confirmam que a proteína do envelope e a proteína NS1 são as melhores candidatas para confecção de antígenos com fins diagnósticos.

Os genes do envelope e NS1 foram inseridos no plasmídeo pFastBac1 o qual faz parte de um sistema de expressão que promove a obtenção de um baculovirus recombinante contendo o gene de interesse através do mecanismo de transposição, conhecido como sistema Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen). O mesmo sistema já foi utilizado para expressar outras proteínas com sucesso como, por exemplo, na avaliação da atividade biológica de duas proteínas, gp41 e p24, do HIV por Joshua *et alli* (2000) ou ainda na expressão do antígeno HCA587 como marcador do hepatocarcinoma humano conforme descreveram Li *et alli* (2003). Proteínas de flavivirus também têm sido expressas com sucesso e mantendo seu padrão antigênico, é o caso da produção de proteínas virais de West Nile virus (WNV) capazes de formar inclusive partículas semelhantes às virais (VLP, do inglês "viral like particles"), conforme descrito por Qiao *et alli* (2004) e de proteínas do vírus da hepatite C e seu estudo na descrição do modo de entrada desse vírus descrito por Saunier *et alli* (2003).

Neste trabalho foram produzidos dois vírus recombinantes, vAcDE contendo o gene do envelope do vírus da Dengue 1 e vAcDENS1 contendo o gene do envelope e o gene NS1 também de Dengue 1. Os vírus recombinantes obtidos foram utilizados para infectar células de inseto e uma análise transcricional foi feita para avaliar a presença do gene no RNA mensageiro celular. Essa análise revelou que as células de inseto estavam sim produzindo RNA mensageiro (mRNA) contendo o gene de interesse. Apesar da obtenção

de bandas maiores que o fragmento esperado amplificado pelo oligonucleotídeo interno ao gene, estes podem ser devidos a diferentes terminações do mRNA já que os baculovirus são conhecidos por produzirem mais de um RNA mensageiro para cada gene e estes podem ter início ou final em diferentes posições no genoma (Miller, 1997). Este mesmo resultado já foi observado por Welzel (2006) e a especificidade do fragmento amplificado foi analisada por uma digestão com a enzima *Not I* na qual foram liberados os fragmentos de tamanho esperado no PCR.

Os vírus recombinantes também foram utilizados para infectar lagartas de *S. frugiperda* e o tecido adiposo destas foi utilizado em um gel de poliacrilamida e posteriormente para uma imunomarcação utilizando anticorpo anti-Dengue. Esse anticorpo reconheceu apenas as bandas pertencentes aos poços nos quais extratos de tecido adiposo de lagarta estavam infectados por vírus recombinantes com proteínas de flavivirus. Entretanto, apesar da marcação ter sido positiva, o tamanho da proteína obtida (cerca de 70 kDa) não foi o esperado (90 kDa para vAcDENS1 e 50 kDa para vAcDE) e pode ser que a marcação seja de uma proteína celular, cuja produção seja induzida pela infecção do vírus recombinante com proteínas de flavivirus. No caso de vAcDENS1, como se trata de duas proteínas expressas de modo fusionado, pode ocorrer alteração no tamanho final da proteína obtida. Além disso, a diferença de modelo de modificações pós-traducionais podem estar envolvidas na alteração do tamanho esperado (Kost *et alli.*, 2005).

Apesar do tamanho não esperado, as proteínas recombinantes apresentam atividade semelhante às proteínas de flavivirus quando foi realizado um ensaio de fusão de membranas em pH ácido. O ensaio simula o que acontece em uma infecção pelo vírus da Dengue, quando, no interior do endossomo, a modificação do pH (acidificação) permite que a membrana viral e a membrana do endossomo se fusionem liberando as partículas

virais para a infecção. Proteínas de flavivirus apresentam alto poder de fusão, especialmente em ambientes com baixo pH (Bressaneli *et alli.*, 2004) e isso pôde ser observado quando comparado ao poder de fusão do vírus vSynVI-Gal, que estava presente, mas em quantidade bem menor do que o observado com vAcDENS1. A capacidade de fusão de membrana de vSynVI-Gal é devido à atividade da proteína gp64 de baculovírus que é uma glicoproteína responsável pela entrada do BV nas células de inseto por endocitose. Esta proteína, da mesma maneira que a proteína do Envelope de Dengue, ajuda na fuga do endossomo por fusão de membranas causada por acidificação (Blissard & Wenz, 1992).

Outros trabalhos testaram a capacidade antigênica de proteínas recombinantes em modelos animais (Eckels *et alli.*, 1994; Zhang *et alli.*, 1998), e algumas produzem reações tão satisfatórias que se tornam candidatas nos testes para a confecção de vacinas tetravalentes para Dengue, em substituição dos vários modelos de vírus atenuados já existentes (Eckels & Putnak, 2003). Algumas proteínas recombinantes já estão sendo utilizadas em testes diagnósticos (Kelly & King, 2000; Cuzzubbo *et alli.*, 2001).

A expressão de proteínas recombinantes através do sistema baculovirus apresenta inúmeras vantagens frente a outros métodos de expressão. Entretanto, o fato de que o vírus causa a morte da célula e a produção da proteína e se resume à fase anterior à morte celular faz com que novas células tenham de ser sempre infectadas com novos vírus recombinantes. Uma alternativa para driblar essa dificuldade é a construção de células estáveis que expressem a proteína de interesse constitutivamente e estas células acabam sendo melhores adaptadas a bio-reatores para uma produção em larga escala (Pfeifer, 1998). Algumas proteínas heterólogas já foram expressas utilizando células de inseto estavelmente transformadas, como exemplo células estáveis capazes de expressar

receptores GABA_A, conforme descrito por Joice et alli., (1993), produção de células de inseto que expressem as enzimas β 1,4-galactosyltransferase e α 2,6-sialyltransferase normalmente presentes em células de mamífero com o objetivo de melhorar a qualidade de modificações pós-traducionais em células de inseto descrita por Hollister & Jarvis, 2001; a construção de células de inseto capazes de produzir ácido siálico como descrito por Aumiller *et alli.*, 2003 ou ainda a expressão de anticorpos específicos humanos para um vírus em células de inseto estavelmente transformadas conforme descrito por Guttieri *et alli.*, 2000. Um vetor foi construído nesse trabalho, contendo o gene NS1 sob o comando do promotor *hsp70* de *D. melanogaster* que será usado para construção de células estavelmente transformadas.

Outra estratégia interessante na obtenção de proteínas recombinantes é a de produzir as proteínas de interesse do vírus da Dengue fusionadas à proteína poliedrina de baculovírus. Essa nova estratégia já foi utilizada para expressar a toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Chang *et alli.*, 2003) e permite que as proteínas sejam obtidas por gradiente de sacarose na extração de poliedros de lagartas infectadas com vírus recombinantes. Com um método de purificação mais específico pode-se avaliar o potencial antigênico de cada proteína com menos interferência das próprias proteínas celulares.

A produção de proteínas recombinantes de Dengue 1 descrita nesse trabalho, assim como a produção de proteínas recombinantes de outros sorotipos de Dengue, só tem a contribuir com um diagnóstico mais rápido e seguro desta doença que vêm se tornando cada vez mais comum no Brasil. Apesar de ser uma doença que apresenta risco fatal apenas em um segundo contato com um sorotipo diferente, é uma doença altamente incapacitante durante o seu período de infecção e uma epidemia de Dengue não é algo difícil de se

estabelecer devido à alta prevalência do mosquito vetor. Testes diagnósticos que não dependam da obtenção do vírus inteiro seriam muito mais baratos do que os utilizados atualmente, em especial porque o vírus da Dengue não tem um modelo animal estabelecido e não se propaga bem *in vitro*. Além do valor elevado, a obtenção de antígenos pela inoculação intracerebral de camundongos recém-nascidos envolve diversas dificuldades técnicas além de exigir a presença de uma estrutura complexa de biotério e laboratórios de biossegurança elevada. A proteína recombinante permitiria ainda uma especificidade maior com relação ao sorotipo e ao vírus, minimizando reações cruzadas com outros flavivirus, por exemplo, bastando para isso, estabelecer que frações da proteína são antigênicas para cada caso. Sem contar que as pesquisas com proteínas recombinantes e seus potenciais antigênicos e imunogênicos são de grande valia para outra área da saúde: pesquisas para confecção de novas vacinas com subunidades do agente etiológico. Não existe ainda uma vacina para Dengue devido à complexidade de confecção de uma vacina tetravalente que não leve ao desenvolvimento de Dengue hemorrágica. Esse desafio pode ser resolvido por utilização de quimeras de proteínas recombinantes que minimizem a reação sorológica do organismo ao vírus. O uso de proteínas recombinantes tanto na área de diagnóstico quanto na área de vacinas apresenta inúmeras vantagens com relação aos métodos tradicionais permitindo um aumento na qualidade e diminuição dos custos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Tomando como base os objetivos estabelecidos no início deste trabalho pode-se concluir que:

- Objetivo 1: Expressar proteínas do vírus da Dengue em células de inseto utilizando o Sistema Baculovirus
 - Conclusão:
 - Análise transcricional positiva
 - Massa molecular da proteína obtida: tamanho não esperado
- Objetivo 2: Avaliar a funcionalidade e antigenicidade das proteínas recombinantes
 - Conclusão:
 - Marcação por anticorpo anti-Dengue
 - Ensaio de fusão de membrana
- Objetivo 3: Construir um vetor para ser utilizado na construção de células de inseto estavelmente transformadas
 - Conclusão:
 - Sucesso na construção do vetor

Deste modo, visando dar continuidade ao trabalho pretende-se:

- Produzir proteínas recombinantes do vírus da Dengue fusionadas à poliedrina;
- Produzir um anticorpo que seja específico para a proteína recombinante e verificar se este reage contra o vírus da Dengue selvagem;
- Realizar novos testes com relação à proteína recombinante atualmente expressa através da infecção dos baculovirus recombinantes produzidos neste trabalho (vAcDE e vAcDENS1) em células de inseto;
- Construir células estáveis que expressem o gene NS1 do vírus da Dengue utilizando o plasmídeo pHSP70NS1 com este gene sobre o controle do promotor HSP70 de *Drosophila melanogaster*;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AILOR, E. & BETENBAUGH, M.J. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. **Biotechnology** v. 10, p. 142-145, 1999.

AHMAD, S.; BASSIRI, M.; BANERJEE, A.K.; YILMA, T. Immunological characterization of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant baculovirus in *Spodoptera exigua* larva: use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. **Virology** v. 192(1), p. 207-216, 1993.

ALTMANN, F.; STAUDACHER, E.; WILSON, I.B.H.; MÄRZ, L. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. **Glycoconjugate Journal** v. 16, p. 109–123, 1999.

ARIF, B.M. The structure of the viral genome. **Current Topics Microbiology and Immunology** v. 131, p. 21-29, 1986.

AUMILLER, J.J, HOLLISTER, J.R, JARVIS, D.L. A transgenic insect cell line engineered to produce CMP-sialic acid and sialylated glycoproteins. **Glycobiology** v. 13(6), p. 497-507, 2003.

BAURMET, T.F.; ITO, S.; WONG, D.T.; LIANG, T.J. Hepatitis C Virus Structural Proteins Assemble into Viruslike Particles in Insect Cells. **Journal of Virology**, v.72(5), p.3827–3836, 1998.

BENZ, G.A. Introduction: historical perspective. In: In: GRANADOS, R.R., FREDERICI, B.A. (Eds). **The Biology of Baculovirus**. Boca Raton: CRC Press, p.1-35, 1986.

BENZ, I. & SCHMIDT, M.A. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. **Molecular Microbiology** v. 45(2), p. 267–276, 2002.

BIELEFELDT-OHMANN, H.; BEASLEY, D.W.C.; FITZPATRICK, D.R.; AASKOV, J.G. Analysis of a recombinant dengue-2 virus–dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. **Journal of General Virology**, v.78, p.2723–2733, 1997.

BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (Eds). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, p. 1-72, 1991.

BISHT, H.; CHUGH, D.A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA N. Expression and purification of Dengue virus type 2 envelope protein as a fusion with hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification** v. 23, p. 84–96, 2001.

BISHT. H.; CHUGH, D.A.; RAJE. M.; SWAMINATHAN, S.S.; KHANNA, N. Recombinant dengue virus type 2 envelope/hepatitis B surface antigen hybrid protein expressed in *Pichia pastoris* can function as a bivalent immunogen. **Journal of Biotechnology** v. 99, p. 97-110, 2002.

BLISSARD, G.W. Baculovirus-insect cell interactions. **Cytotechnology** v. 20, p. 73-93, 1996.

BLISSARD, G.W. & WEINZ, J.R.; Baculovirus gp64 Envelope Glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. **Journal of Virology** v.66, p. 6829-6835, 1992.

BONALDO, M.C.; CAUFOUR, P.S.; FREIRE, M.S.; GALLER, R. The Yellow Fever 17D Vaccine Virus as a Vector for the Expression of Foreign Proteins: Development of New Live Flavivirus Vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 95(1), p.215-223, 2000.

BRESSANELI, S.; STIASNY, K.; ALISSON, S.L.; STURA, E.A.; DUQUERROY, S.; LESCAR, J.; HEINZ, F.X.; REY, F.A. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *European Molecular Biology Organization (EMBO)* v. 23(4), p. 728-738, 2004.

CARVALHO, S. E. S., RIBEIRO, B. M., NAGATA, T. Complete nucleotide sequence of dengue virus sorotipo 1 isolated in the Federal District, Brazil In: XVI National meeting of Virology, 2005, Salvador. **Virus Reviews & Research**. v.10. p.145 - 145, 2005.

CASTRO, M.E.B.; SOUZA, M.L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J.C.M.; RIBEIRO, B.M. *Biologia Molecular de Baculovirus e seu uso no Controle Biológico de Pragas no Brasil*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 34, Nº 10, p. 1733-1761, 1999.

CHANG, J.H., CHOI, J.Y.; JIN, B.R., ROH, J.Y.; OLSZEWSKI, J.A.; SEO, S.J.; O'REILLY, D.R.; JE, Y.H.; An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. *Journal of Invertebrate Pathology* v. 84, p. 30-37, 2003.

CHATURVEDI, U.C.; AGARWAL, R.; ELBISHBISHI E.A.; MUSTAFA, A.S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, p. 183-188, 2000.

CHATURVEDI, U.C.; SHRIVASTAVA, R.; NAGAR, R. Dengue vaccines: Problems & prospects. **The Indian Journal of Medical Research** v. 121, p. 639-652, 2005.

CHATURVEDI, U.C.; NAGAR, N.; SHRIVASTAVA, R. Macrophage & dengue virus: friend or foe?. **The Indian Journal of Medical Research** v. 124, p. 23-40, 2006.

COLOGNA, M.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent Dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. **Journal Of Virology** v. 79(2), p. 853–859, 2005.

CROOK, N.E. Baculoviridae: sub-group B: comparative aspects of granulosis viruses. In: KURSTAK, E. (Eds). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker. p. 73-110, 1991.

CUZZUBBO, A.J.; ENDY, T.P.; NISALAK, A.; KALAYANAROOJ, S.; VAUGHN, D.W.; OGATA, S.A.; CLEMENTS, D.E.; DEVINE, P.L. Use of Recombinant Envelope Proteins for Serological Diagnosis of Dengue Virus Infection in an Immunochromatographic Assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** v. 8(6), p. 1150-1155, 2001.

DEGALLIER, N.; TEIXEIRA, J.M.; VILARINHOS, P.D.; PINTO, S.C.; PEREIRA, R.D. First isolation of dengue 1 virus from *Aedes aegypti* in Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 33(1), p. 95-96, 2000.

De PAULA. S.O. & FONSECA, B.A.L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 8(6), p. 390-398, 2004.

DESPRES, P.; DIETRICH, J.; GIRARD, M; BOULOY, M. Recombinant baculoviruses expressing yellow fever virus E and NS1 proteins elicit protective immunity in mice. **Journal of General Virology**, v.72, p.2811-2816, 1991.

DWYER, K.G. & GRANADOS, R.R. Mapping *Pieris rapae* granulosis virus transcripts and their in vitro translation products. **Journal of Virology** v. 62, p. 1535-1542, 1988.

ECKELS, K.H.; DUBOIS, D.R.; SUMMERS, P.L.; SCHLESINGER, J.J.; SHELLY, M; COHEN, S.; ZHANG, Y.M.; LAI, C.J.; KURANE, I.; ROTHMAN, A. Immunization of monkeys with baculovirus-dengue type-4 recombinants containing envelope and nonstructural proteins: evidence of priming and partial protection. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene** v. 50, p. 472-78, 1994.

ECKELS, K.H. & PUTNAK, R. Formalin-inactivated whole virus and recombinant subunit flavivirus vaccines. **Advances in Virus Research** v. 61, p. 395-418, 2003.

ENGELHARD, E.K., KAM-MORGAN, L.N.W.; WASHBURN, J.O.; VOLKMAN, L.E. The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M

Nuclear polyhedrosis virus. **Proceedings in the National Academy of Sciences** v. 91, p. 3324-3327, 1994.

FALCONAR, A.K.I. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin /adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Arquives of Virology** v. 142, p. 897-916, 1997.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press. 2005.

FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. p. 33-59. In: MILLER, L.K. (Eds). **The baculoviruses**. New York; Plenum Press. p. 447, 1997.

FEIGHNY, R; BURROUS, J; McCOWN, J; HOKE, C; PUTNAK, R. Purification of native dengue-2 viral proteins and the ability of purified proteins to protect mice. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene** v. 47, p. 405-12, 1992.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MONATH, T.P.; MELNICK, J.L.; ROIZMAN, B.; SRAUS, S.E. **Field-Virology**. Lippincott Williams & Wilkins, p. 2950, 2001.

FONSECA, B. M. & FONSECA, S. N. S. Dengue virus infections. **Current Opinion in Pediatrics** v.14, p. 67–71, 2002.

FUNK, C.N. & CONSIGLI, R.A. Evidence for zinc binding by two structural proteins *Plodi interpunctella* granulosis virus. **Journal of Virology** v. 66, p. 3168-3171, 1992.

GRANADOS, R.R.; GUOXUN, L.; DERSKSEN, A.C.G.; MCKENNA, K.A.A. new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 64, p. 260-266, 1994.

GRINNA, L.S. & TSCHOPP, J.F. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast** v. 5, p. 107-115, 1989.

GROSS, C.H. & SHUMAN, S. Characterization of a baculovirus-encoded RNA 5' triphosphatase. **Journal of Virology** v. 72(9), p. 7057-7063, 1998.

GUARINO, L.A., XU, B., JIN, J., DONG, W. A virus encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. **Journal of Virology** v. 72(10), p. 7985-7991, 1998.

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

GUTTIERI, M.C., BOOKWALTER, C., SCHMALJOHN, C. Expression of a human, neutralizing monoclonal antibody specific to Puumala virus G2-protein in stably transformed insect cells. **Journal of Immunological Methods** v. 246, p 97-108, 2000.

GUT-WINIARSKA, M., JACOBS, L.; KERSTENS, H.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K. A highly specific and sensitive sandwich blocking ELISA based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein B. *Journal of Virological Methods* v. 88, p. 63-71, 2000.

GUZMÁN, M.G. & KOURÍ, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases** v. 2, p. 33–42, 2001.

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

HESS, R.T. & FALCON, L.A. Observations on the interaction of baculoviruses with the plasma membrane. **Journal of General Virology** v. 36, p. 525-530, 1977.

HOLLISTER, J. R. & JARVIS, D. L. Engineering lepidopteran insect cells for sialoglycoprotein production by genetic transformation with mammalian ,1,4-galactosyltransferase and R2,6-sialyltransferase genes. **Glycobiology** v. 11, p. 1-9, 2001.

HORTON, H.M. & BURAND, J.P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology** v. 67, p. 1860-1868, 1993.

JAISSWAL, 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.

JAISSWAL, S.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN, S. High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification** v. 33, p. 80-91, 2004.

JARVIS, D.L.; REILLY, L.M.; HOOVER, K.; SCHULTZ, C.; HAMMOCK, B.D.; GUARINO, L.A. Construction and characterization of immediate early baculovirus pesticides. **Biological Control** v. 7, p. 228-235, 1996.

JARVIS, D.L.; KAWAR, Z.S.; HOLLISTER, J.R. Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. **Biotechnology** v. 9, p. 528-533, 1998.

JARVIS, D.L.; HOWE, D.; AUMILLER, J.J. Novel Baculovirus Expression Vectors That Provide Sialylation of Recombinant Glycoproteins in Lepidopteran Insect Cells. **Journal of Virology**, v. 75(13), p. 6223–6227, 2001.

JOSHUA, M.N.; QI, Y.; FU-HUA, Y.; YOUNG-XIU, H. Comparison of the biological activities of human immunodeficiency virus 1 P24 and GP41 expressed in *Spodoptera frugiperda* cells by use of bac-to-bac system. **Acta virologica** v. 44(3), p. 125-130, 2000.

JOYCE, K.A.; ATKINSON, A.E.; BERMUDEZ, I.; BEADLE, D.J.; KING, L.A: Synthesis of functional GABA-A receptors in stable insect cell lines. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) v.335(1), p. 61-64, 1993.

KELLY, E.P.; GREENE, J.J.; KING, A.D.; INNIS, B. L. Purified dengue 2 virus envelope glycoprotein aggregates produced by baculovirus are immunogenic in mice. **Vaccine**. v. 18, p. 2549-2559, 2000.

KELLY, E.P.& KING, A.D. Recombinant Dengue virus DNA fragment. Patent number :USA 6,074,865.2000

KOST, T.A.; CONDREAY, J.P.; JARVIS, D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v.23(5), p.567-575, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.227, p.680-685. 1970.

LEE, H.H. & MILLER, L.K. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology** v. 27, p. 754-767, 1978.

LEITMEYER, K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D. M.; SALAS, R.; VILLALOBOS DE CHACON, I.; RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal Of Virology**, v. 73(6), p. 4738–4747, 1999.

LI, B.; WU, H.Y.; QIAN, X.P.; LI, Y.; CHEN, W.F. Expression, purification and serological analysis of hepatocellular carcinoma associated antigen HCA587 in insect cells. **World Journal of Gastroenterology** v. 9(4), p. 678-682, 2003.

LU, A. & MILLER, L.K. Regulation of baculoviruses late and very late expression. p. 193-216. Em: Lois K. Miller. **The baculoviruses**. New York; Plenum Press. p. 447, 1997.

McLACHLIN, J.R. & MILLER, L.K. Stable transformation of insect cells to coexpress a rapidly selectable marker gene and an inhibitor of apoptosis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal** v.33, p. 575-579, 1997.

MAHONEY, F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. **Clinical Microbiology Reviews** v. 12(12), p. 351–366, 1999.

MARX, F.; GRITSUN, T.S.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; GOULD, E.A. Diagnostic immunoassays for tick-borne encephalitis virus based on recombinant baculovirus protein expression. **Journal of Virological Methods**, v.91, p.75–84, 2001.

MARUNIAK, J.E.. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R., FREDERICI, B.A. (Eds). **The Biology of Baculovirus**. Boca Raton: CRC Press, p. 275, 1986.

MARZOCHI, K. B. F. Dengue in Brazil- situation, transmission and control- A proposal for ecological control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 89(2), p.235-245, 1994.

MILLER, L.K. (Eds). **The Baculoviruses**. New York; Plenum Press. p. 447, 1997.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. **Microbial Physiology**, 4. ed. Wiley-Liss, N.Y.: John Wiley & Sons, Inc., Publication, p. 735, 2002.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 100(12), p. 6986–6991, 2003.

MORII, M.; YOSHIMATSU, K.; ARIKAWA, J.; KARIWA, H.; ZHOU G.; TAKASHIMA, I. Antigenic Characterization of Hantaan and Seoul Virus Nucleocapsid Proteins Expressed by Recombinant Baculovirus: Application of a Truncated Protein, Lacking an Antigenic Region Common to the Two Viruses, as a Serotyping Antigen. **Journal of Clinical Microbiology** v. 36(9), p. 2514-2521, 1998.

MORTON, C.L. & POTTER, P.M. Comparison of Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, Spodoptera frugiperda, and COS7 Cells for Recombinant Gene Expression: Application to a Rabbit Liver Carboxylesterase. **Molecular Biotechnology** v. 16(3), p. 193-202, 2000.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 257-289, 1999.

MURPHY, F.A.; FAUKQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. (Eds.). Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. New York: Springer-Verlag Wien, **Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses** p. 104-113, 1995.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V.A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. New York. W.H. Freeman and Company, 1992.

PASSARELI, A.L.; MILLER, L.K. Identification and characterization of Lef-1, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression. **Journal of Virology** v. 67(6), p. 3481-3488, 1993.

PAYNE, C. C. Insect pathogenic viruses as pest control agents. **Fortschritte der Zoologie**, v. 32, p. 183-200, 1986.

PENNOCK, G.D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L.K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. **Molecular and Cellular Biology** v.4, p.399-406, 1984.

PFEIFER, T.A: Expression of heterologous proteins in stable cell culture. **Current Opinion in Biotechnology** v 9, p. 518-521, 1998.

QIAO, M.; ASHOK, M.; BERNARD, K.A.; PALACIOS, G.; ZHOU, Z.H.; LIPKIN, W.I.; LIANG. T.J. Induction of Sterilizing Immunity against West Nile Virus (WNV), by Immunization with WNV-Like Particles Produced in Insect Cells. **The Journal of Infectious Diseases** v. 190, p. 2104–2108, 2004.

REY, F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 100(12), p. 6899–6901, 2003.

RIBEIRO, B.M. & CROOK, N.E. Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length cry1Ab and cry1Ac genes from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal Medical Biological Research** v. 31(6), p. 763-769, 1998.

RICO-HESSE R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology** v. 147, p. 479–493, 1990.

RODRIGUES, J.C.M.; SOUZA, M.L.; REILLR, D.O.; VELLOSO, L.M.; PINEDO, F.J.R.; RAZUCK, F.B.; RIBEIRO, B.; RIBEIRO, B.M. Characterization of the Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus*. **Virus Genes** v. 22, N° 1, p. 103-112, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SAMUEL, P. P. & TYAGI, B.K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes **The Indian Journal of Medical Research** v.123, p. 615-628, 2006.

SAUNIER, B.; TRIYATNI, M.; ULIANICH, L.; MARUVADA, P.; YEN, P.; KOHN, L.D. Role of the Asialoglycoprotein Receptor in Binding and Entry of Hepatitis C Virus Structural Proteins in Cultured Human Hepatocytes. **Journal of Virology** v. 77(1), p. 546-559, 2003.

SIEBURTH, P. J. & MARUNIAK, J. E. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cellular Developmental Biology** v.24, p. 195-198, 1988.

SILVA, J. Jr. B.; SIQUEIRA, J.B. Jr.; COELHO, G.E.; VILARINHOS, P.T.; PIMENTA, F.G. Jr. Dengue in Brazil: **Current Situation and Prevention and Control Activities. Epidemiological Bulletin** v. 23(1), p. 3-6, 2002.

SIMMONS, M.; NELSON, W.M.; WU, S.J.; HAYES, C.G. Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 58(5), p. 655-662, 1998.

SLACK, J.M. & BLISSARD, G.W. Measurement of membrane fusion activity from viral membrane fusion proteins based on a fusion-dependent promoter induction system in insect cells. **Journal of General Virology** v.82, p.2519-2529, 2001.

SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D.; FRASER, M.J. Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. **Molecular and Cellular Biology** v. 3(12), p. 2156-2165, 1983.

SMITH, G.E.; VLAK, J.M.; SUMMERS, M.D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000 molecular weight protein. **Journal of Virology** v. 45, p. 215-225, 1983.

SRIVASTAVA, A.K.; PUTNAK, J.R.; WARREN, R.L.; HOKE, C.H. Jr. Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. **Vaccine** v. 13(13), p. 1251-1258, 1995.

STAROPOLI, I.; CLEMENT, J.M.; FRENKIEL, M.P.; HOFNUNG, M.; DEUBEL, V. Dengue virus envelope glycoprotein can be secreted from insect cells as a fusion with the maltose-binding protein. **Journal of Virological Methods**, v.56, p.179-189, 1996.

STAROPOLI, I.; FRENKIEL, M.P.; MEGRET, F.; DEUBEL, V. Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. **Vaccine**, v.15, p.1946-1954, 1997.

STEPHENSON, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. **Bull World Health Organ** v. 83(4), p.308-314, 2005.

SUGRUE, R.J.; FU, J.; HOWE, J.; CHAN, Y.C. Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. **Journal of General Virology** v. 78, p. 1861-1866, 1997.

SUGRUE, R.J.; CUI, T.; XU, Q.; FU, J.; CHAN, Y.C. The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods** v. 69, p. 159-169, 1997.

TANI, H.; LIMN, C.K.; YAP, C.C.; ONISHI, M.; NOZAKI, M.; NISHIMUNE, Y.; OKAHASHI, N.; KITAGAWA, Y.; WATANABE, R.; MOCHIZUKI, R.; MORIISHI, K.; MATSUURA, Y. In Vitro and In Vivo Gene Delivery by Recombinant Baculoviruses. **Journal of Virology** v. 77(18), p. 9799-9808, 2003.

THIEM, S.M.; DU, X.; QUENTIN, M.E.; BERNER, M.M. Identification of baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line. **Journal of Virology** v. 70(4), p. 2221-2229, 1996.

TODD, J.W., PASSARELLI, A.L., LU, A., MILLER, L.K. Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays. **Journal of Virology** v. 70, p. 2307-2317, 1996.

VAN REGENMORTEL, .M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Virus taxonomy**. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, 2000.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 36(2), p. 275-293, 2003.

VOLKMAN, L.E. The 64K envelope protein of budded *Autografa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Current Topics in Microbiological Immunology** v. 131, p. 103-118, 1986.

VOLKMAN, L.E. & HOM, G. *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus chiA Is Required for Processing of V-CATH. **Virology** v. 277, p. 178- 183, 2000.

WELZEL, A. Baculovirus recombinantes contendo genes de proteases são mais virulentos contra *Spodoptera frugiperda*. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular – Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

WILLIAMS, G.V. & FAULKNER, P. Cytological changes and viral morphogenesis during Baculovirus infection. In: MILLER, L.K. (Eds). **The baculoviruses**. Plenum New York p. 61-107, 1997.

WINSTANLEY, D. & CROOK, N. E. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. **Journal of General Virology** v. 74, p. 1599-1609, 1993.

XU, B., YOO, S., GUARINO, L.A. Differential transcription of baculovirus late and very late promoters: fractionation of nuclear extracts by phosphocellulose chromatography. **Journal of Virology** v. 69(5), p. 2912-2917, 1995.

ZANOTTO, P.M.A., KESSING, B.D. MARUNIAK, J.E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 62, p. 147-164, 1993.

ZHANG, Y.; HAYES, E. P.; McCARTY, T. C.; DUBOIS, D. R.; SUMMERS, P. L.; ECKELS, K.H.; CHANOCK, R. M.; LAI, C. Immunization of mice with Dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by Baculovirus recombinant induces resistance to Dengue Virus Encephalitis. **Journal of Virology** v. 62, p. 3027-3031, 1988.

ZHAO, B.; PRINCE, G.; HORSWOOD, R.; ECKELS, K.; SUMMERS, P.; CHANOCK, R.; LAI, C. Expression of dengue viral structural proteins and non-structural protein NS1 by a recombinant vaccinia virus. **Journal of Virology** v. 61(12), p. 4019-4022, 1987.