



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

**Desenvolvimento de um teste sorológico capaz de
detectar anticorpos anti-NS1 de *Dengue virus***

RAÍSSA ALLAN SANTOS DOMINGUES

Orientador: Tatsuya Nagata

Co-orientador: Bergmann Morais Ribeiro

Brasília, 2013.



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

Desenvolvimento de um teste sorológico capaz de detectar anticorpos anti-NS1 de *Dengue virus*

RAÍSSA ALLAN SANTOS DOMINGUES

Orientador: Tatsuya Nagata

Co-orientador: Bergmann Morais Ribeiro

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

Brasília, 2013.

RAÍSSA ALLAN SANTOS DOMINGUES

**Desenvolvimento de um teste sorológico capaz de
detectar anticorpos anti-NS1 de *Dengue virus***

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

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (Orientador)

Profa Dra. Eliane Ferreira Noronha (UnB)

Prof Dr. Fernando Lucas de Melo (UnB)

Profa Dra. Anabele Azevedo Lima (Suplente) (UnB)

*“They say if you dream about something,
more than once, it’s sure to come true.”*

Alice in Wonderland

Dedico
Aos incrivelmente amados pais,
José Domingues Jr. e Carla Domingues,
Sem eles nada seria possível: vida,
mestrado, sonhos e realizações!
À minha família e amigos tão amados.

AGRADECIMENTOS

Este mestrado é mais um dos meus sonhos realizados e esta dissertação nada mais é do que um resumo destes dois maravilhosos anos e uma vitória de todos que contribuíram pra sua execução e finalização.

Gostaria de agradecer de coração a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho:

Ao orientador Prof. Dr. Tatsuya Nagata, que me orienta a 4 anos, desde a iniciação científica. Sempre atencioso, compreensivo e participativo. Um orientador brilhante e difícil de encontrar por ai, que sabe dar puxões de orelha na hora certa e motivar seus alunos a sempre estudar e buscar soluções para os problemas. Sabe moldar um aluno e tem paciência para ensinar desde o primeiro gel de agarose no estágio do calouro até o pós-doc ou pesquisador completo, sempre incentivando a buscar o melhor para cada um. Me aceitou com a minha teimosia e maneira de trabalhar a la “my way” e acho que hoje vendo que “deu certo” entende meu jeito teimoso de trabalhar.

Ao co-orientador Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro, por toda a ajuda e conselhos no mundo dos Baculovírus, por todas as orientações, já que sem elas não chegaria aos resultados encontrados.

À orientadora Dra. Flávia Barreto, que me acolheu no laboratório LABFLA da Fiocruz-RJ e me orientou brilhantemente em toda a parte de testes sorológicos, acreditou no meu trabalho e me apoiou com toda sua alegria e jeito encantador de ser.

À banca por ter aceitado o convite: Profa Dra. Eliane, Anabele e Fernando.

Aos colaboradores: Daniel de Araújo, Monique Lima e Larizza Matos.

Daniel, sem ele este trabalho não teria sido realizado! Um dos pesquisadores mais brilhantes que já conheci, sou fã nº1. Eficiente, dedicado, professor cheio de didática, estudioso (sabe tudo de Baculovírus, Biologia em geral e muitas outras coisas) e com o coração enorme (bondoso e generoso, um exemplo de ser humano), sempre deixa seu trabalho de lado para ajudar seus amigos (me incluindo nisso) e até colegas e desconhecidos. Das contribuições da bancada: Leu o artigo referente ao peptídeo imunogênico (artigo de 1990, não teria achado sozinha!), me ajudou no desenho dos primers, no protocolo de purificação das proteínas e na pior parte: imunização dos camundongos e punção cardíaca dos animais (sem dúvida a parte mais sofrida pra mim, pra ele e pro Léo, também!) e foi um grande amigo em todos os momentos me dando forças quando achei que não ia conseguir. Vai fazer muita falta quando for pro EUA, mas com

certeza vai ser um pesquisador brilhante (muito mais do que já é!). Sim, ele merece um “big” parágrafo, só pra ele!

Monique, me acolheu no laboratório LABFLA e me ajudou na padronização e elaboração de todos os testes sorológicos, deixando seu trabalho de lado para me ajudar, com toda paciência e dedicação.

Larizza, minha IC que me ajudou durante a etapa de clonagem, com carinho e dedicação.

A todos os colegas de laboratório sem exceção: Bruna, Layssa, Kelly e Ana (amigas de todos os dias), Fran, Cícero, Câmara, Karol, Thaís, Raquel, Kênia, Lorena, Rafael, Simone, Andressa, Adriana colegas e companheiros de bancada. Aos Baculovirologistas: Anabele (me ensinou a pipetar e todos os protocolos de clonagem quando eu era estagiária em 2009, no começo de tudo!), Léo, Fabrício, Lorena, Fábiana, Mariana, Briana, Greice, Maria, Carol, Raul, Rapha Bonadio, Mari Carneiro, Ju Rocha, Suzana, Roberto, Deborah, Samuel, Dani, Miguel, Clarinha, Fernando, Jhon. E virologistas vegetais: Prof.Dr. Renato Resende, Virgínia, Ellen, Rosana, Mariana, Rayane, Dani, Anelise, Fernandinha, Ana Fernanda, Karina, Athos, Mikhaeil, André. E a todos que passaram no laboratório nestes 4 anos de estrada (desculpa se esqueci de alguém!). As colegas do LABFLA: Bianca e Jaqueline. Agradeço a todos que contribuíram, correndo géis, emprestando soluções, tirando bactérias do shaker e placas da estufa no final de semana, dando palpite em protocolos ou com um simples, vai dar certo! Um laboratório é um grupo onde a vitória de um é a vitória do grupo.

A minha família amada:

Aos meus pais: José Domingues e Carla Magda Domingues. Sem eles nada disso seria possível, biologicamente eu não estaria aqui, mas o que realmente importa é todo o apoio incondicional nos estudos e apoio a todas as minhas decisões, sempre me provendo tudo que fosse necessário para alcançar meus objetivos. Mesmo não escolhendo a medicina ou epidemiologia, sei que como farmacêutica e cientista posso dar orgulho a vocês e contribuir para a saúde pública nos bastidores ou na minha tão amada bancada. Meu amor é incondicional e não tem palavras que expliquem ou consigam retribuir tudo que foi feito por mim.

A minha irmã: Gabriela Domingues ou Biribinha por todo apoio e por estar ao meu lado sempre, apesar de todas as brigas, o amor não cabe no peito.

A toda a minha família: meus avós Yolanda, Elza e Idelfonso pelo apoio e carinho durante toda minha vida. (Aos pães de mel e quitutes da minha vó Yoyo), meus padrinhos queridos: Idelson e Raquel por todo apoio e pelas correções na dissertação sempre que precisei pela minha querida madrinha Raquel. A minha tia Kika e Greg por todo apoio mesmo à distância (via

Skype) ou na Disney. Meus queridos primos: Luli, Tete, Pepe, Bubu, Ju, Rafa, Thi, Ben e Nick. E a todos os Domingues e Santos que são as melhores famílias que eu poderia ter.

Aos meus amigos/irmãos: Aninha, Isa, Cela, Nega, Beka, Luisão, Leo, Cascãozito, Raul, Fabi, Nany, Anninha e Jaque, que sei que posso contar pra vida inteira e amo cada um como irmão. A minha família carioca: Cintya e Celo, por terem me acolhido com irmã e toda vez que vou pro Rio, não importa o tempo, me hospedarem na maior alegria. As amigas farmacêuticas: Clara, Clari, Nanda e Tonton. Aos amigos de infância: Nilo, Gabriel e Ciça que mesmo com a distância sei que são eternos amigos e torcem sempre por mim. A todos que passaram na minha vida, saindo ou ficando, mas deixando grandes marcas de amizade, cumplicidade, afeto e carinho.

À Universidade de Brasília por estes 6 anos e meio de muito trabalho, porém de muitas alegrias e realizações.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Deus, pela vida e pela chance que me foi dada.

A todos vocês, muito obrigada!

ÍNDICE

AGRADECIMENTO.....	v
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
ABREVIACÕES E SÍMBOLOS UTILIZADOS.....	xvii
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Dengue.....	1
1.2 Epidemiologia.....	2
1.3 Aspectos Clínicos.....	3
1.3.1 Febre Clássica da Dengue.....	4
1.3.2 Febre Hemorrágica da Dengue e Síndrome do Choque da Dengue.....	4
1.3.3 A Dengue na criança.....	6
1.4 Transmissão viral.....	6
1.5 Patogênese da Dengue.....	7
1.6 Prevenção e controle.....	8
1.7 Tratamento.....	9
1.8 Vacinas.....	9
1.9 Estrutura molecular e biológica do vírus da dengue.....	13
1.10 A Proteína não-estrutural 1 (NS1).....	15
1.10.1 Peptídeo imunogênico de NS1.....	16
1.11 Ciclo de infecção viral.....	17
1.12 Diagnóstico de Dengue.....	18
1.12.1 Isolamento viral.....	18
1.12.2 Detecção de RNA viral.....	19
1.12.3 Detecção de anticorpos (IgM e IgG).....	20
1.12.4 Detecção de anticorpos neutralizantes.....	21
1.12.5 Detecção de antígeno.....	21
1.13 Cenário atual da Dengue no Brasil.....	24
1.14 ELISA Direto e Indireto.....	26
1.15 Expressão de proteínas heteróloga.....	26
1.16 Baculovírus – como vetor de expressão.....	27

2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo geral.....	29
2.2	Objetivos específicos.....	29
3	JUSTIFICATIVA	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	Plasmídeo e bactérias.....	31
4.2	Baculovírus e células de inseto.....	31
4.3	Obtenção das amostras.....	32
4.4	Extração de RNA Viral.....	32
4.5	RT-PCR.....	33
4.6	PCR.....	33
4.7	Clonagem no vetor pGEM [®] -T Easy e sequenciamento.....	35
4.8	Clonagem no vetor de transferência e sequenciamento.....	36
4.8.1	Gene NS1.....	36
4.8.2	Peptídeo AP derivado do gene NS1.....	37
4.9	Construção dos baculovírus recombinantes.....	38
4.10	Construção do vírus.....	40
4.10.1	Transfecção.....	40
4.10.2	Infecção.....	40
4.10.3	Titulação viral.....	40
4.11	Análise de expressão das proteínas obtidas.....	41
4.12	Purificação das proteínas.....	42
4.13	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos cristais obtidos por purificação dos peptídeos.....	42
4.14	Alinhamento das sequencias de aminoácidos dos peptídeos imunogênicos.....	43
4.15	Imunização dos ratos.....	43
4.16	Purificação de IgG.....	43
4.17	<i>Western-blotting</i> para análise de IgG.....	44
4.18	Padronização do ELISA indireto.....	44
4.19	ELISA indireto.....	45
4.19.1	Soros utilizados.....	45
4.19.2	Determinação do <i>cut-off</i>	45
4.19.3	Tabela de contingência para avaliar a validade interna do teste.....	46
4.19.4	Ensaio realizados.....	47
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Amplificação do gene NS1 de DENV1-4.....	48
5.2	Amplificação dos peptídeos do gene NS1 de DENV1-4.....	48

5.3	Clonagem no vetor pGEM [®] -T Easy.....	49
5.4	Clonagem nos vetores de transferência.....	49
5.5	Construção do baculovírus recombinante.....	51
5.6	Construção do vírus.....	52
5.6.1	Transfecção.....	52
5.6.2	Infecção.....	54
5.7	Titulação viral.....	54
5.8	Análise de expressão das proteínas obtidas.....	55
5.9	Purificação das proteínas obtidas.....	56
5.10	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	58
5.11	Alinhamento das sequências dos peptídeos imunogênicos.....	58
5.12	Imunização dos ratos.....	60
5.13	Purificação de IgG.....	60
5.14	<i>Western-blotting</i> para análise de IgG.....	60
5.15	Padronização de ELISA indireto.....	62
5.16	ELISA indireto.....	63
6	DISCUSSÃO.....	73
7	PERSPECTIVAS.....	79
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de casos notificados de Dengue no Brasil, 2011 e 2012 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).....3
- Figura 2.** Classificação e nível de severidade em casos de Dengue (WHO, 2007).....5
- Figura 3.** RNA genômico dos *Flaviviruses*, linear, ssRNA(+) com cerca de 10-12kb codificando uma única ORF clivada e traduzida em três proteínas estruturais (C, M e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). A extremidade 3' não é poliadenilada e a extremidade 5' possui *cap* metilado que permite a tradução porteira. (Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/24.html > Acesso em: fev. 2013). Cistron e clivagem da poliproteína do DENV. C = proteína do “core”, M = membrana, E = envelope, NS = proteínas não-estruturais.....13
- Figura 4.** Estrutura da partícula de DENV e proteínas estruturais pertencentes ao vírion. (Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/24.html > Acesso em: fev. 2013).....14
- Figura 5.** Esquema adaptado do ciclo de infecção celular viral dos flavivirus (HEINZ e STIASNY, 2012) Com permissão.....18
- Figura 6.** Captura de antígeno de NS1 no soro de pacientes infectados com DENV1. Eixo Y - OD do soro testado de pacientes diluído 1:10. Eixo X - Dias após o início da febre (ALCON et al, 2002) Com permissão.....21
- Figura 7.** Gráfico de detecção de IgM (A) e NS1 (B) por kits comerciais: Standard Diagnostics, Pan-E - Panbio, Merlin e Biogenex. Eixo X - % de positividade. Eixo Y - Dias de doença. Com permissão.....25
- Figura 8.** Esquematização dos ensaios imunoenzimáticos de diagnóstico: ELISA Direto e Indireto. (Disponível em: <http://www.epitomics.com/products/product_info/1257, http://www.leinco.com/indirect_elisa >, adaptados. Acesso em: fev. 2013).....26
- Figura 9.** Mapa gênico do plasmídeo doador pFB1-6xHis-AcPH. Tn7L, Tn7R = braços homólogos para transposição, fl origin = origem de replicação para cópias múltiplas, bla promoter = promotor de transposição de β -lactamase, Amp(R) = gene de resistência a ampicilina, pUC origin = origem de replicação oriundo de pUC19, Gm(R) = gene de resistência a Gentamicina, PH promoter = promotor da poliedrina, 6xHis = hexa-histidina, NcoI = sítio de

clonagem NcoI, AcPH = gene de poliedrina de AcMNPV (ARDISSON-ARAÚJO, 2012).....31

Figura 10. Cultura de células de inseto utilizadas neste trabalho. BTI-Tn5B-4 derivada da lagarta do repolho. Em menor (direita) e maior aumento (esquerda). Escala: Barra = 20µm.....32

Figura 11. Mapa gênico dos plasmídeos construídos no presente trabalho: pFB1-6xHis-NS1/DENV1-AcPH e pFB1-6xHis-NS1/DENV2-AcPH. O gene NS1 de DENV foi inserido no sítio de clonagem NcoI. Tn7L, Tn7R = braços homólogos para transposição, fl origin = origem de replicação para cópias múltiplas, bla promoter = promotor de transposição de β-lactamase, Amp(R) = gene de resistência a ampicilina, pUC origin = origem de replicação oriundo de pUC19, Gm(R) = gene de resistência a Gentamicina, PH promoter = promotor da poliedrina, 6xHis = hexa-histidina, NS1/DENV1= gene NS1 de DENV1, NS1/DENV2 = gene NS1 de DENV-2, PstI e HindII = sítios de clonagem, AcPH = gene de poliedrina de AcMNPV.....37

Figura 12. Mapa gênico representando os plasmídeos construídos no presente trabalho: pFB1-6xHis-AP-NS1/DENV-AcPH. Os nucleotídeos referentes ao peptídeos AP-NS1 de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 foram inseridos separadamente no sítio de clonagem Nco I do vetor de transferência pFB1-6xHis-AcPH. Ampicilina = gene de resistência a ampicilina, Tn7L, Tn7R = braços homólogos para transposição, Gentamicina = gene de resistência a Gentamicina, figura de um triângulo = promotor da poliedrina, 6xHis = hexa-histidina, AP-NS1 = nucleotídeos referentes aos peptídeos de DENV1-4 separadamente, Poliedrina = gene de poliedrina de AcMNPV, SV40 PoliA = sinal de poliadenilação.....38

Figura 13. Sistema de Bac-to-bac para construção dos baculovírus recombinantes (Invitrogen)38

Figura 14. Eletroforese de gel de agarose 1%. (A) e (B) Análise de reação de amplificação do gene NS1 de DENV1-4. (C) Análise de reação de amplificação dos fragmentos referentes aos peptídeos do gene NS1. (A) 1 – GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – PCR NS1-DENV1; 3 – PCR NS1-DENV2. (B) 1 – GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – PCR NS1-DENV3; 3 – PCR NS1-DENV4. (C) 1 – GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – PCR AP-NS1-DENV1; 3 – PCR AP-NS1-DENV2; 4 - PCR AP-NS1-DENV3; 5 – PCR AP-NS1-DENV4.....48

Figura 15. Eletroforese de gel de agarose 1%. (A) Análise do perfil de restrição de pGEM-NS1-DENV1-4 digerido com enzima de restrição EcoRI (NEB). (B) Análise do perfil de restrição de pGEM-NS1-DENV1-4 com enzima de restrição EcoRI (NEB). (A) 1 – GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – pGEM-NS1-DENV1/EcoRI; 3 – pGEM-NS1-DENV2/EcoRI; 4 –

pGEM-NS1-DENV3/EcoRI; 5 – pGEM-NS1-DENV4/EcoRI. (B) Gel de agarose 1%: 1 – GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – pGEM-AP-NS1-DENV1/EcoRI; 3 – pGEM-AP-NS1-DENV2/EcoRI; 4 – pGEM-AP-NS1-DENV3/EcoRI; 5 – pGEM-AP-NS1-DENV4/EcoRI.....49

Figura 16. Eletroforese de gel de agarose 1% contendo análise do perfil de restrição dos vetores de transferência obtidos pela ligação do gene NS1 de DENV1-4. Marcador de peso molecular: GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). (A) pFB1-6xHis-NS1/DENV1-AcPH (6546 pb) digerido com PstI (NEB) gerando fragmentos de 5800 pb e 750 pb. (B) pFB1-6xHis-NS1/DENV2-AcPH (6549 pb) digerido com HindIII (NEB) gerando fragmentos de 5500 pb, 540 pb e 510 pb (banda única). (C) pFB1-6xHis-NS1/DENV3-AcPH (6543 pb) digerido com PciI (NEB) gerando fragmentos de 5560 pb e 980 pb. (D) pFB1-6xHis-TROMB/DENV4-AcPH (6591 pb) digerido por digestão dupla com ApaI (NEB) e SalI (NEB) gerando fragmentos de 5530 pb e 1060 pb..... 50

Figura 17. Eletroforese de gel de agarose 1% contendo PCR dos bacmídeos: BAC-AP-NS1/DENV1 (2, 3, 4, 5) e BAC-NS1/DENV2 (6, 7, 8, 9), amplificados com combinações dos primers M13 Rev com os primers específicos For (2, 4, 6, 8) e M13 For com os primers específicos Rev (3, 5, 7, 9). Marcador de peso molecular: (1) GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas).....51

Figura 18. Células BTI-Tn5B1 não infectadas ('Mock').....52

Figura 19. Análise de transfecção de células BTI-Tn5B-4 em microscópio óptico 96 h.p.i. vAc-AP-NS1/DENV1 (superior à esquerda); vAc-AP-NS1/DENV2 (superior à direita); vAc-AP-NS1/DENV3 (inferior à esquerda); vAc-AP-NS1/DENV4 (inferior à direita).....53

Figura 20. Análise de transfecção de células BTI-Tn5B-4 em microscópio óptico 96 h.p.i. vAc-NS1/DENV1 (à esquerda); vAc-NS1/DENV2 (à direita).....53

Figura 21. Análise de infecção de células BTI-Tn5B-4 em microscópio óptico 96 h.p.i. vAc-NS1/DENV1 (à esquerda); vAc-NS1/DENV3 (à direita).....54

Figura 22. Análise de expressão dos peptídeos imunogênicos em células BTI-Tn5B-4, 96h.p.i. (A) Análise eletroforética por gel SDS PAGE 12% corado com azul de Coomassie (B) *Western Blotting*. 1 – Marcador de massa molecular 'PageRuler™ Prestained Protein Ladder' (Fermentas); 2 – Célula não infectada ('Mock'); 3 – Células infectadas com vAc-AP-NS1/DENV2; 4 - Células infectadas com vAc-AP-NS1/DENV3; 5 - Células infectadas com vAc-AP-NS1/DENV4. Tamanho do peptídeo = 36kDa.....55

Figura 23. Análise de expressão de NS1-DENV1, NS1-DENV2 e AP-NS1/DENV1 em células BTI-Tn5B-4, 96h.p.i. Análise eletroforética por gel SDS PAGE 12% corado com azul de Coomassie. (A) Expressão de NS1-DENV1 e NS1-DENV2. 1 – Marcador de massa molecular ‘Prestained Protein Ladder’ (Thermo Scientific); 2 – Células infectadas com vAc-NS1/DENV1; 3 – Células infectadas com vAc-NS1/DENV2; 4 – Célula não infectada (‘Mock’). Tamanho de NS1-DENV = 75kDa. (B) Expressão de AP-NS1/DENV1. 1 – Marcador de massa molecular ‘Prestained Protein Ladder’ (Thermo Scientific); 2 – Células infectadas com vAc-AP-NS1/DENV1. Tamanho de AP-NS1-DENV1 = 29kDa..... 56

Figura 24. Frações formadas após ultracentrifugação de proteínas recombinantes. 1 - NS1/DENV1; 2 - NS1/DENV2; 3 - AP-NS1/DENV2; 4 - AP-NS1/DENV3; 5 - AP-NS1/DENV4.....57

Figura 25. Purificação proteica por gradiente de sacarose 80-40%. NS1-DENV1-2 e AP-NS1-DENV2-4 purificado por gradiente de sacarose 80-40%. (A) Análise eletroforética por gel SDS PAGE 12% corado com azul de Coomassie (B) *Western Blotting*. 1 – Marcador de massa molecular ‘EZ-Run Prestained Protein Marker’ (Fisher BioReagents); 2 – NS1-DENV1; 3 – NS1-DENV2; 4 – AP-NS1-DENV2; 5 – AP-NS1-DENV3; 6 – AP-NS1-DENV4; 7 – AcMNPV expressando a poliedrina (29kDa). Tamanho de NS1-DENV cerca de = 75kDa. Tamanho de AP-NS1-DENV1 cerca de = 36kDa.....57

Figura 26. MEV dos cristais proteicos formados pela expressão das proteínas: AP-NS1/DENV2, AP-NS1/DENV3, AP-NS1/DENV4. Escala: Barra = 1µm.....58

Figura 27. Alinhamento das sequências de aminoácidos dos peptídeos imunogênicos, considerando à polaridade (A), hidrofobicidade (B) e estrutura secundária (C) realizada no Geneious® 6.1.4.....59

Figura 28. Previsão da estrutura terciária de D3-AP-NS1 por SWISS-MODEL (Disponível em: <<http://swissmodel.expasy.org/workspace>> Acesso em: jul de 2013).....59

Figura 29. *Western Blotting* contendo proteínas recombinantes NS1/DENV1 (cerca de 75kDa) e AP-NS1/DENV4 (cerca de 36kDa). (A) Membrana incubada com anticorpo primário anti-hexa-histidina (6xHis) monoclonal de camundongo. 1 – Marcador de massa molecular ‘EZ-Run Prestained Protein Marker’ (Fisher BioReagents); 2 – NS1/DENV1; 3 - NS1/DENV4 (B) Membrana incubada com antissoro obtido de rato imunizado com NS1/DENV1. 1 – Marcador de massa molecular ‘EZ-Run Prestained Protein Marker’ (Fisher BioReagents); 2 – NS1/DENV1; (C) Membrana incubada com antissoro obtido de rato imunizado com AP-

NS1/DENV4 1 – Marcador de massa molecular ‘EZ-Run Prestained Protein Marker’ (Fisher BioReagents); 2 – AP-NS1/DENV4.....61

Figura 30. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com peptídeo AP-NS1-DENV2. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV1-4 (soro prevalente: DENV-2, n= 24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....63

Figura 31. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com peptídeo AP-NS1-DENV3. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV1-4 (soro prevalente: DENV-3, n= 24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....64

Figura 32. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com peptídeo AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV1-4 (soro prevalente: DENV-4, n= 24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....65

Figura 33. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-1 e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....66

Figura 34. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-2 e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....66

Figura 35. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-3 e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....67

Figura 36. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-4 e controles negativos: soros negativos

(NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....67

Figura 37. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-1-4 (soro prevalente: DENV-2, n= 24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....68

Figura 38. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-1-4 (soro prevalente: DENV-3, n=24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....68

Figura 39. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-1-4 (soro prevalente: DENV-4, n=24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....69

Figura 40. ELISA indireto de quatro placas de 96 poços sensibilizadas com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4, separadamente e com a mistura dos três (Mix) e incubada com soro negativo. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X – Sensibilização da placa com os peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4 e mistura dos três (Mix). n = número de soros testados.....70

Figura 41. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizadas com o peptídeo AP-NS1-DENV2 e incubada com soro de paciente diagnosticado com Febre Amarela (FA), Sarampo e Rubéola. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X – Soro de FA, Sarampo e Rubéola, controles negativos: pacientes saudáveis (NAIVE), soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....71

Figura 42. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizadas com o peptídeo AP-NS1-DENV3 e incubada com soro de paciente diagnosticado com Febre Amarela (FA), Sarampo e Rubéola. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X – Soro de FA, Sarampo e Rubéola, controles negativos: pacientes saudáveis (NAIVE), soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....71

Figura 43. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizadas com o peptídeo AP-NS1-DENV4 e incubada com soro de paciente diagnosticado com Febre Amarela (FA), Sarampo e Rubéola. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X – Soro de FA, Sarampo e Rubéola, controles negativos: pacientes saudáveis (NAIVE), soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....	72
Figura 44. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizadas com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4 e incubada com soro de paciente diagnosticado com Febre Amarela (FA), Sarampo e Rubéola. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X – Soro de FA, Sarampo e Rubéola, controles negativos: pacientes saudáveis (NAIVE), soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.....	72
Figura 45. Sequência nucleotídica do gene NS1 de DENV1. Em destaque nucleotídeos referentes ao peptídeo de NS1: AP-NS1-DENV1.....	86
Figura 46. Sequência de aminoácidos da proteína NS1 de DENV1 (aa57 a 126).....	86
Figura 47. Sequência nucleotídica do gene NS1 de DENV2. Em destaque nucleotídeos referentes ao peptídeo de NS1: AP-NS1-DENV2.....	86
Figura 48. Sequência de aminoácidos da proteína NS1 de DENV2 (aa57 a 126).....	88
Figura 49. Sequência nucleotídica do gene NS1 de DENV3. Em destaque nucleotídeos referentes ao peptídeo de NS1: AP-NS1-DENV3.....	88
Figura 50. Sequência de aminoácidos da proteína NS1 de DENV3 (aa57 a 126).....	88
Figura 51. Sequência nucleotídica do gene NS1 de DENV4. Em destaque nucleotídeos referentes ao peptídeo de NS1: AP-NS1-DENV4.....	89
Figura 52. Sequência de aminoácidos da proteína NS1 de DENV4 (aa57 a 126).....	89

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Candidatos à vacina da dengue em estágio pré-clínico de desenvolvimento (Adaptado de SCHMITZ et al, 2011).....	12
Tabela 2. Sensibilidade dos kits de detecção de NS1 de DENV: Pan-E Dengue Early ELISA from Panbio (Brisbane, Australia), Platelia Dengue NS1 AG from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) e Standard Diagnostics dengue virus NS1 antigen ELISA (Standard Diagnostics, South Korea).....	24
Tabela 3. Especificidade dos kits de detecção de NS1 de DENV: Pan-E Dengue Early ELISA from Panbio (Brisbane, Australia), Platelia Dengue NS1 AG from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) e Standard Diagnostics dengue virus NS1 antigen ELISA (Standard Diagnostics, South Korea).....	25
Tabela 4. Primers para amplificação do gene NS1 de DENV 1-4 por PCR.....	34
Tabela 5. Programa utilizado para amplificação do gene NS1 de DENV 1-4.....	35
Tabela 6. Primers para amplificação dos peptídeos AP do gene NS1 de DENV 1-4 por PCR.....	35
Tabela 7. Programa utilizado para amplificação dos peptídeos AP do gene NS1 de DENV1-4 amplificação dos peptídeos AP do gene NS1 de DENV 1-4 por PCR.....	35
Tabela 8. Primers para amplificação dos bacmídeos recombinantes (M13 For e M13 Rev) amplificação dos peptídeos AP do gene NS1 de DENV 1-4 por PCR.....	40
Tabela 9. Programa utilizado para amplificação dos bacmídeos recombinantes utilizando primers M13.....	40
Tabela 10. Tabela de contingência para avaliar a validade interna do teste.....	47
Tabela 11. Análise de sensibilidade das placas de ELISA indireto sensibilizadas com a mistura dos três peptídeos: AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4.....	69
Tabela 12. Tabela comparativa de sensibilidade e especificidade dos testes de detecção de NS1 e IgM combinados.....	78

ABREVIACOES E SÍMBOLOS UTILIZADOS

°	graus Celsius
>	maior que
<	menor que
6xHis	cauda de hexa-histidina
xg	velocidade de sedimentação gravitacional
AcMNPV	baculovirus <i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
Ac-PH	promotor da poliedrina do AcMNPV
ADE	' <i>Antibody –Dependent Enhanced</i> '
AP	peptídeo
BCIP	'5-bromo-4chloro-3-indolyphosphate p-toluidine salt'
BTI-Tn5B1-4	linhagem derivada do lepidptero <i>T. ni</i>
cDNA	DNA sintetizado a partir de um RNA mensageiro
CF	teste de fixação de complemento
C	proteína do core
DC	' <i>Dendritic cells</i> '
DENV	' <i>dengue virus</i> '
DENV-1	' <i>dengue virus</i> ' sorotipo 1
DENV-2	' <i>dengue virus</i> ' sorotipo 2
DENV-3	' <i>dengue virus</i> ' sorotipo 3
DENV-4	' <i>dengue virus</i> ' sorotipo 4
DF	' <i>dengue fever</i> '
DHF	' <i>dengue hemorrhagic fever</i> '
DNA	Desoxirribonucleato
dNTP	Desoxinucleotdeos
d.p.i	dias ps infecção
dsRNA	' <i>double-stranded Ribonucleic acid</i> '
DSS	' <i>dengue shock syndrome</i> '

E	proteína do envelope
EDTA	ácido etilenediamina tetraacético
ELISA	' <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> '
For	primer 'Forward'
g	grama
GAG	glicosaminoglicanos
h	horas
h.p.i	horas pós infecção
IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina-1 β
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JEV	' <i>Japanese encephalitis virus</i> '
kDa	kiloDalton
kb	kilo (pares) base
LB	meio de cultura Lauri-Bertani
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HI	inibição de hemaglutinação
μ g	microgramas
μ g/ml	microgramas/mililitro
M	proteína associada à membrana
MAC-ELISA	' <i>IgM antibody capture - Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> '
μ l	microlitro
ml	mililitros
μ m	micrômetro
mM	milimolar

mNS1	proteína não-estrutural 1 associada à membrana
NASBA	<i>'nucleic acid sequence-based amplification'</i>
NBT	<i>'nitro-blue tetrazolium chloride'</i>
ng	nanogramas
NS1	proteína não-estrutural 1
NS2A	proteína não-estrutural 2A
NS2B	proteína não-estrutural 2B
NS3	proteína não-estrutural 3
NS4A	proteína não-estrutural 4A
NS4B	proteína não-estrutural 4B
NS5	proteína não-estrutural 5
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>'open reading frame'</i>
PAGE	<i>'polyacrylamide gel electrophoresis'</i>
PAF	<i>'Platelet-activating factor'</i>
PBS	<i>'Phosphate buffered saline'</i>
pb	pares de base
pH	concentração de íon hidroxônio livre
PRNTs	<i>'plaque reduction neutralizing tests'</i>
Q-PCR	<i>'Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction'</i>
RdRp	<i>'RNA-dependent RNA polymerase'</i>
Rev	primer <i>'Reverse'</i>
RNA	<i>'Ribonucleic acid'</i> (ácido ribonucleico)
RT-PCR	<i>'Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction'</i>
SCF	<i>'soluble complement-fixing antigen'</i>
SDS	<i>'sodium dodecyl sulfate'</i>
sNS1	proteína não-estrutural 1 secretada
ssRNA	<i>'single-stranded Ribonucleic acid'</i>
UFP	unidade formadora de placa

UTR	untranslated region
UV	ultra-violeta
V	volts
vAc	recombinante da espécie AcMNPV
v/v	relação volume/volume
WNV	' <i>West Nile virus</i> '
w/v	relação peso/volume
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopinosídeo
YFV	' <i>Yellow fever virus</i> '

RESUMO

A Dengue é uma doença de grande importância epidemiológica no país, com cerca de seiscentos mil novos casos por ano, sem tratamento específico e com controle inadequado do vetor. O diagnóstico atual da Dengue na rede pública de saúde está baseada em MAC-ELISA que captura anticorpos IgM contra proteínas estruturais virais como a proteína do envelope. Entretanto, esta metodologia ainda causa falso-positivos e negativos da Dengue, por possuir baixa especificidade e sensibilidade. O trabalho desenvolvido apresenta como inovação uma nova ferramenta para diagnóstico da doença Dengue via detecção do anticorpo anti-NS1 (proteína não-estrutural) do *Dengue virus* (DENV) no plasma do paciente infectado. A proteína NS1 é secretada e circula no plasma no início da fase febril da Dengue, pacientes produzem anticorpos específicos ao NS1 do DENV, além de anticorpos contra proteínas estruturais como as proteínas do envelope, de membrana e do core. O projeto tem como objetivo produzir antígenos recombinantes da proteína NS1 e de peptídeos imunogênicos de NS1 de DENV sorotipos 1, 2, 3 e 4 utilizando baculovírus/célula de inseto como sistema de expressão e validação de antígeno como ferramenta para ELISA de imunocaptura utilizando soros de pacientes infectados com Dengue nos sete primeiros dias pós-infecção. O protótipo do kit de imunocaptura proposto apresentou especificidade máxima (100%) e sensibilidade elevada (89,8%-98,7%). Portanto, o teste proposto pode ser viabilizado para validação e posteriormente, caso validado, pode ser disponibilizado à população, e desta maneira, proporcionar melhora na diagnose e na evolução do quadro dos pacientes acometidos. Este trabalho foi uma parceria de duas instituições: Universidade de Brasília e o laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Palavras-chave: *Dengue virus*, NS1, Baculovírus recombinante, diagnóstico, ELISA.

ABSTRACT

Dengue is a disease that has an outstanding epidemiological importance in Brazil, there are about six hundred thousand new cases per year, there isn't a specific treatment and the insect vector control is inadequate. The current diagnosis of Dengue in the public health is based on MAC-ELISA, which capture IgM antibody against structural protein from the viral envelope. However, this methodology generates false-negative and false-positive of Dengue, since it has low sensitivity and specificity. This work presents a new tool for diagnosis of Dengue through detection of the antibody anti-NS1 (non-structural 1) of *Dengue virus* (DENV) in the plasma of infected patients. The NS1 protein is secreted and circulates in the plasma in the early stage of Dengue Fever. Patients generate specific antibody against DENV NS1, besides antibody against structural proteins as envelope, membrane and core. This project aims for development recombinant antigens of the complete NS1 protein and shorter immunogenic peptide of the NS1 from DENV serotypes 1, 2, 3 and 4 produced by baculovirus system /insect cells. For the purpose, the validation of recombinant antigen were evaluated for immune capture ELISA using patients' sera infected with DENV in the first seven days post infection. The immune capture prototype kit using these recombinant antigens of NS1 showed maximum specificity (100%) and high sensitivity (89,8%-98,7%). The prototype kit could be viable for futher validation and, then, possibly for mass production for large scale use. Thus it can contribute to improved diagnosis and the condition for patients treatment. This work was a partnership of two institutes: Universidade de Brasilia and Laboratório de Flavivirus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz).

Keywords: *Dengue virus*, NS1, recombinant baculovirus, diagnosis, ELISA.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

A dengue é uma das principais doenças virais transmitidas por artrópodes (arbovírus humano) nas regiões subtropicais e tropicais, possui grande importância para a saúde pública em termos de morbidade e mortalidade e distribuição geográfica em mais de 100 países (GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectam anualmente e mais de 2 milhões de pessoas estão sob o risco de adquirirem a infecção. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil vão a óbito em consequência da dengue (WHO, 2009).

A manifestação da doença varia de uma forma branda semelhante a sintomas de influenza chamada Febre da Dengue ('Dengue Fever', DF) a formas graves, algumas vezes fatais, caracterizadas por hemorragias e choque, conhecidas como Febre Hemorrágica da Dengue ou Síndrome do Choque da Dengue (do inglês 'dengue hemorrhagic fever'/'dengue shock syndrome', DHF/DSS) (GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005).

Dengue virus (DENV) são classificados em quatro sorotipos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, pertencem ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, que contempla 60 espécies de arbovírus humano, no qual a Febre Amarela ('*Yellow fever virus*', YFV) é o protótipo e inclui diversas espécies como a Encefalite Japonesa ('*Japanese encephalitis virus*', JEV) e a Febre do Nilo ('*West Nile virus*' WNV), dentre outras (WESTAWAY et al, 1985 apud HENCHAL e PUTNAK, 1990).

A doença é causada pela transmissão do vírus a humanos suscetíveis através da picada de mosquitos *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* e com menor frequência por *A. albopictus*, *A. polynesiensis* e *A. scutellaris*. A infecção por um sorotipo confere imunidade ao longo da vida do paciente contra o sorotipo infectado, no entanto, confere proteção parcial e transiente aos outros três sorotipos (GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005).

Teoricamente, a prevenção tanto da dengue quanto de outras infecções virais de arbovírus humano pode ser alcançada pelo controle do vetor ou por estratégias de imunização. No entanto para o controle da Dengue, ambas as estratégias são ainda ineficientes, a cada ano é crescente o número de pacientes infectados e apesar do incessante trabalho de vários grupos de pesquisa no desenvolvimento de vacinas, até o presente momento não há uma vacina eficaz e segura contra os quatro sorotipos (KORAKA, 2007).

Devido à dificuldade de controlar o vetor, tratar a doença e desenvolver estratégias de imunização, o diagnóstico precoce ainda é uma ferramenta importante que leva a um tratamento mais adequado, caso haja evolução do quadro (KORAKA, 2007). O diagnóstico atual da Dengue na rede pública de saúde está baseada em MAC-ELISA que captura anticorpos IgM contra proteínas estruturais virais como a proteína do envelope, esta metodologia ainda produz resultados falso-negativos e não possibilita uma diagnose precoce, portanto, no Brasil ainda há

uma demanda de estudos na obtenção de novas estratégias para uma diagnose mais sensível, específica e com menor custo.

1.2 Epidemiologia

Dengue é a doença viral transmitida por mosquitos com propagação mais rápida em todo o mundo. Nos últimos 50 anos, a incidência de casos aumentou 30 vezes com o aumento da expansão geográfica para novos países (WHO, 2009).

As primeiras epidemias registradas de doenças com sintomas *dengue like* ("joint fever") ocorreram em 1779 em surtos simultâneos em Batavia (Jakarta) e Cairo (SILER; HALL; HITCHENS, 1296 apud HENCHAL; PUTNAK, 1990). Em seguida, surtos de dengue foram registrados na Filadélfia (1780), Zanzibar (1823 e 1870), Calcutta (1824, 1853, 1871, 1905) e Hong Kong (1901). Em 1922, a epidemia de dengue no sul dos Estados Unidos afetou aproximadamente 1 a 2 milhões de pessoas (SABIN, 1959 apud HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Em 1950, houve uma campanha de erradicação da Febre Amarela e o combate ao vetor *A. aegypti*, comum às duas doenças, eliminou a transmissão de doença com sintomas *dengue like* no país (FRAIHA, 1968). No entanto, na década de 60, houve uma reinfestação do vetor, provavelmente oriunda dos países vizinhos que não erradicaram o vetor completamente.

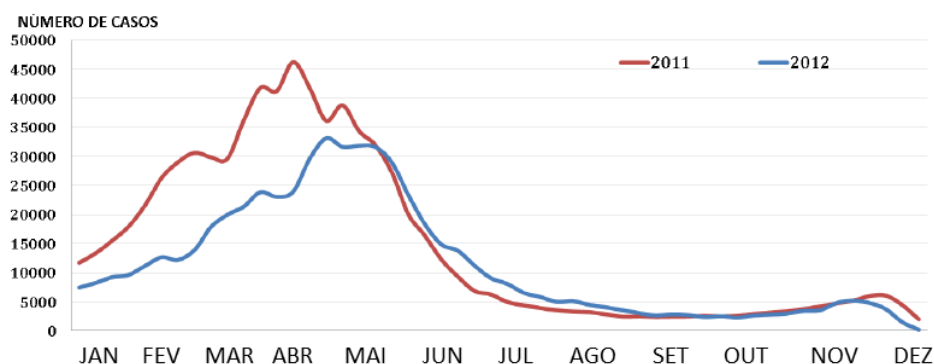
No Brasil, a primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em Boa Vista, RR (1981-1982), causada pelos sorotipos 1 e 4 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Em seguida, ocorreram registros no estado de São Paulo (1851, 1853 e 1916) e no estado do Rio de Janeiro (1923). Nos anos 90 foram registrados novos casos de dengue em São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco e Bahia (1990), Rio de Janeiro, São Paulo e Mato Grosso do Sul (1991) e em Tocantins e Mato Grosso (1992). (PONTES; RUFFINO-NETO, 1994).

Em 2012, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou um total de 588.478 casos de dengue no país, excluindo os descartados. (Figura 1). A Região Sudeste teve o maior número de casos (249.383 casos; 42,4%), seguida da Região Nordeste (224.588 casos; 38,2%), Centro-Oeste (66.665 casos; 11,3%); Norte (42.250 casos; 7,2%) e Sul (5.592 casos; 0,9%). Em relação ao ano de 2011, observou-se redução de 23% dos casos no país.

Foram confirmados 4.055 casos graves no país. As regiões com maior número de casos graves confirmados foram: Sudeste (1.547); seguido pelo Nordeste (1.333); Centro Oeste (973) e região Norte, com menor número de casos (185).

Em relação aos óbitos, foram confirmados 284 óbitos e até 28 de dezembro de 2012, havia 466 casos graves e 129 óbitos em investigação que poderiam ser confirmados ou descartados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Casos de dengue , Brasil, 2011 e 2012



Fonte: Sinan adaptado

Figura 1. Número de casos notificados de Dengue no Brasil, 2011 e 2012 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

No ano de 2013, até o dia 25 de março, houve um aumento de 190% de casos notificados de dengue em todo o país. Foram divulgados, entre 1º de janeiro e 16 de fevereiro de 2013, 204.650 novos casos, 324 casos graves e 33 óbitos. No mesmo período de 2012, foram 70.489 notificações de novos casos, 577 casos graves e 41 casos de morte, segundo o Ministério da Saúde (Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2013-02-25/triplica-numero-de-casos-de-dengue-no-brasil>> Acesso em: abr. 2013).

1.3 Aspectos Clínicos

A infecção pelo vírus da DENV pode causar diversos sintomas clínicos, variando de um quadro assintomático, febre moderada, a febre hemorrágica com ou sem choque. Após o período de incubação viral ocorre o aparecimento dos sintomas que dependendo da gravidade irá se enquadrar em: doença febril atípica, febre clássica da dengue (DF), febre hemorrágica da dengue (DHF) e/ou síndrome do choque da dengue (DSS) (KORAKA, 2007).

O quadro clínico de DF e DHF/DSS possuem características em comum: viremia com duração de 5 a 8 dias, febre persistente de 2 a 7 dias, dor de cabeça, mialgia, dor nos ossos e articulações, erupção cutânea, acompanhadas frequentemente com leucopenia, ocasionalmente com surgimento de trombocitopenia e hemorragia cutânea. A marca patológica que determina a doença grave e distingue DHF de DF e outras febres hemorrágicas virais é extravasamento de plasma/vascular resultando no aumento da permeabilidade vascular e homeostasia anormal. Fatores e biomarcadores que poderiam ser usados na identificação do risco individual de evolução para DHF/DSS ainda são desconhecidos (NOISAKRAN et al, 2010). Sequelas permanentes não foram associadas à infecção (GUBLER, 1998).

1.3.1 Febre clássica da Dengue

A febre clássica da Dengue (DF) é caracterizada pelo aparecimento de febre súbita com temperatura inicial que pode atingir de 38.9° C a 40.5° C e pode durar de 2 a 7 dias e varia em sinais e sintomas não específicos como: dor de cabeça, dor retro orbital, mialgia, mal-estar, náusea, vômito, dor nas articulações, fraqueza e erupções cutâneas. Pacientes podem apresentar quadro de anorexia, alteração no paladar e garganta levemente inflamada, linfadenopatia, ocasionalmente apresentam: constipação e com menor frequência: diarreia e sintomas respiratórios (GUBLER, 1998). Pacientes com DF podem ter um período de convalescência prolongada com depressão, fraqueza e bradicardia (KAROKA, 2007).

O quadro hematológico é caracterizado por granulocitopenia absoluta: diminuição da contagem de células brancas periféricas, assim como trombocitopenia: diminuição da contagem de plaquetas (KAROKA, 2007). Pode-se observar, também, o aumento do nível plasmático de várias substâncias tais como: elastase, ácido hialurônico, trombosmodulina solúvel, óxido nítrico, moléculas solúveis de adesão e células endoteliais circulantes (PAWITAN, 2011).

Outros sintomas reportados foram manifestações neurológicas incluindo: encefalopatia, polineurites, mononeuropatia periférica e manifestações cardiovasculares como miocardites (PATEY, 1993).

1.3.2 Febre Hemorrágica da Dengue e Síndrome do Choque da Dengue

DHF é caracterizada por febre alta (40° C ou mais, persistindo de 2 a 7 dias), hemorragia acompanhada do aumento da permeabilidade vascular, hepatomegalia e insuficiência circulatória. Durante a fase aguda não é possível diferenciar DF de DHF (KAROKA, 2007).

A patofisiológica que marca a fase crítica e evolução do quadro é o aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de fluidos, cujo mecanismo ainda é desconhecido, porém sabe-se que o sistema imune desempenha um importante papel. É comum observar em pacientes infectados uma rápida queda de plaquetas de 250.000/ μ L para menos que 100.000/ μ L de 2 a 3 dias, mas em pacientes em fase grave a contagem de plaquetas pode chegar a \leq 5000/ μ L. O início da fase crítica é determinado por evidência de extravasamento de fluido, por diagnóstico clínico ou radiológico demonstrando efusão pleural ou ascites e/ ou evidência de hemoconcentração com um aumento do hematócrito (RAJAPAKSE; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2012).

Manifestações hemorrágicas podem aparecer em quadros moderados a graves. Hemorragia de pele incluindo petequias e púrpura são as mais comuns, seguido de sangramento gengival, epistaxe, menorragia e hemorragias gastrointestinais. Hematúria ocorre com menor frequência e icterícia é rara (GUBLER, 1998). Dependendo da gravidade de DHF, o extravasamento de plasma pode ser leve com recuperação espontânea após a infusão de fluidos. Nos casos graves,

o extravasamento de plasma torna-se crítico, o paciente desenvolve a síndrome do choque da dengue (DSS), que pode ser fatal se não for tratado corretamente (WHO, 1997).

O diagnóstico precoce é fundamental na DHF, pacientes que iniciam com rapidez a infusão de fluídos podem modificar o quadro de gravidade da doença. Geralmente, trombocitopenia e hemoconcentração são detectáveis antes do início do choque. DSS é caracterizado pelos mesmos sintomas de DHF, incluindo pulso rápido, fraco, queda na pressão sanguínea, dor abdominal aguda e hipotensão (Figura 2). Durante o choque profundo o pulso e a pressão sanguínea se tornam indetectáveis, caso o paciente não receba tratamento adequado, o mesmo pode chegar a óbito entre 12 a 24 horas, após o início do choque (WHO, 2007).

Pacientes com DHF e DSS apresentam leucopenia, trombocitopenia (com contagem de plaquetas $<100,000/\text{mm}^3$), hemoconcentração, hepatomegalia e elevação de enzimas do fígado. Aumento no hematócrito indica extravasamento de plasma e está presente em todos os casos de DHF com ou sem choque. Hemoconcentração é resultado do aumento da permeabilidade vascular, levando ao extravasamento do plasma no compartimento extravascular, presente na maioria dos pacientes com DHF e DSS. Nos casos graves de DSS o volume do plasma pode ser reduzido em até 20%. Alterações vasculares, trombocitopenia e desordens de coagulação são os principais fatores envolvidos na alteração da hemostasia durante a DHF e DSS (ERAM, 1979).



Figura 2. Classificação e nível de severidade em casos de Dengue (WHO, 2007).

1.3.3 A dengue na criança

A dengue na criança pode ser assintomática ou apresentar-se como uma síndrome febril clássica viral, ou com sinais e sintomas inespecíficos: adinamia (fraqueza), sonolência, recusa da alimentação e de líquidos, vômitos, diarreia ou fezes amolecidas. Em crianças menores de dois anos de idade, especialmente em menores de seis meses, podem ocorrer sintomas como cefaleia, dor retro-orbitária, mialgias e artralguas manifestada por choro persistente, adinamia e irritabilidade, geralmente com ausência de manifestações respiratórias, podendo-se confundir com outros quadros infecciosos febris, próprios dessa faixa etária.

Na criança, o início da doença pode passar despercebido e o quadro grave ser identificado como a primeira manifestação clínica. O agravamento, em geral, é súbito, diferente do que ocorre no adulto, que é gradual, em que os sinais de alarme de gravidade são mais facilmente detectados. O exantema, quando presente, é máculo-papular, podendo apresentar-se sob todas as formas (pleomorfismo), com ou sem prurido, precoce ou tardiamente.

Entre o terceiro e o sétimo dia do início da doença, a febre cede, surgindo sinais e sintomas como vômitos importantes e frequentes, dor abdominal intensa e contínua, hepatomegalia dolorosa, desconforto respiratório, sonolência ou irritabilidade excessiva, hipotermia e derrames cavitários (pleural, pericárdico, ascite). Esses sinais e sintomas alertam para a possibilidade de extravasamento plasmático e evolução para formas graves da doença (DHF/DSS).

A síndrome de extravasamento vascular é representada por endotelite, desencadeada por uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) ao vírus e à resposta imunoamplificada do paciente, levando-se a uma perda plasmática para interstício de líquidos, eletrólitos e proteínas. É caracterizada por hemoconcentração, hipoalbuminemia e derrames cavitários (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Alguns estudos tentam relacionar a evolução do quadro de DSS em crianças com achados clínicos que incluem: sensibilidade abdominal, hepatomegalia, letargia e sangramento e achados laboratoriais: contagem de plaquetas $\leq 75,000/\text{mm}^3$ e valor de hematócrito de 50% ou aumento de 22% do valor de basal de hematócrito (PAWITAN, 2011).

As formas graves da doença podem manifestar-se com sinais de disfunção orgânica: cardiovascular, respiratória, hepáticas, hematológica do sistema nervoso central (SNC) e renal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

1.4 Transmissão viral

Os humanos são infectados pelo vírus da dengue através da picada do mosquito fêmea infeccioso. *Aedes aegypti*, um mosquito tropical altamente domesticado, é o vetor do ciclo urbano endêmico/epidêmico, o ciclo de maior importância para a saúde pública que ocorre em grandes centros urbanos nas regiões tropicais. *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. polynesiensis* e *A.*

scutellaris são vetores do ciclo rural endêmico que ocorre em vilarejos rurais com menor população humana (GUBLER, 1998), principalmente em algumas partes da Ásia e da África (WHO, 2009).

Após a picada do mosquito infeccioso, o vírus requer um período de incubação de 4 a 7 dias (em alguns pacientes pode variar de 3 a 14 dias), em seguida, o humano infectado pode apresentar febre aguda acompanhada por uma variedade de sinais e sintomas não específicos. Durante o período febril agudo que pode durar de 2 a 10 dias, o vírus da dengue permanece circulante na corrente sanguínea (GUBLER, 1998). Se outro mosquito *Aedes* picar o humano infectado no período de viremia este mosquito se tornará infectado, o vírus irá infectar o intestino médio do mosquito em seguida se espalhará sistematicamente por um período de 8 a 12 dias. Após o período de incubação extrínseca, o vírus poderá ser transmitido para outros humanos saudáveis através da picada. O período de incubação extrínseca é influenciado pelas condições do ambiente, principalmente a temperatura, no entanto o vírus permanece infeccioso pelo resto da sua vida (WHO, 2009).

Vários fatores podem influenciar a dinâmica de transmissão viral, incluindo: fatores climáticos e ambientais, interação do patógeno com o hospedeiro e fatores imunológicos da população. O clima tem influência direta na biologia do vetor e em sua abundância e distribuição, por consequência é um determinante importante na epidemia de doenças transmitidas por vetores (WHO, 2009).

A. aegypti é um dos vetores transmissores de arbovírus mais eficientes porque é altamente antropofílico, frequentemente picam várias vezes antes de completar a ovogênese e o mosquito se desenvolve próximo aos humanos. Transmissão vertical (transovariana) do vírus da dengue foi demonstrada no laboratório, mas raramente ocorre no ambiente (WHO, 2009).

1.5 Patogênese da Dengue

A patogênese da infecção por DENV pode ter início com a penetração do vírus em monócitos e células dendríticas (FIGUEIREDO, 1999). A ativação destas células leva a indução da produção de citocinas como interleucina-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), interferon- α (IFN- α), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), além do fator de ativação de plaquetas (PAF), ácidos araquidônicos e óxido nítrico (NO). O nível sérico elevado destas citocinas interagindo com linfócitos T (LT) 'helper' ativados leva ao surgimento dos sintomas globais da dengue: febre e mal-estar (LEI et al, 2001). Considerando que a dengue é uma doença aguda e com curto prazo, pode-se atribuir a inibição da replicação de DENV aos fatores IFN- α , NO e TNF- α , embora as reações inflamatórias estejam mantidas (FIGUEIREDO, 1999).

Há indícios que a circulação de citocinas inflamatórias produzidas por monócitos e células dendríticas durante DF pode estar relacionada à ativação de fatores de coagulação e células endoteliais, apesar do mecanismo molecular ainda não estar completamente elucidado.

Mecanismos mediados pelo sistema imune relacionados à reação cruzada de anticorpos e à liberação de citocinas podem causar danos tanto a monócitos, células dendríticas e células do endotélio vascular quanto a outras células alvo (linfócitos e hepatócitos). A ativação de células T de memória resulta em cascatas de citocinas inflamatórias incluindo TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8 e outros mediadores químicos que aumentam a permeabilidade vascular endotelial ou provoca a morte de células alvo por apoptose (FIGUEIREDO, 1999).

A teoria ADE (do inglês ‘Antibody-Dependent Enhanced’) que esteve associada à patogênese de dengue grave por muitos pesquisadores durante anos (LEI et al, 2001) trata-se do fenômeno de facilitação por anticorpos da penetração viral em macrófagos, afirmando que nos casos de infecção sequencial por dengue apresentando DHF/DSS, os anticorpos preexistentes, obtidos quando da infecção prévia por outro tipo viral, não neutralizam o segundo vírus infectante de tipo diferente e amplificam a infecção, facilitando ao novo tipo infectante a penetração em macrófagos (FIGUEIREDO, 1999). Entretanto, estudos recentes demonstraram que a patogênese da dengue grave é multifatorial dependendo do próprio vírus, do sistema imunológico, além de outros fatores do hospedeiro para a evolução do quadro para DHF/DSS. (LEI et al, 2001). A especificidade, afinidade e o título dos anticorpos e a acessibilidade de epítomos determinam a capacidade dos anticorpos de DENV de neutralização ou amplificar a infecção (SCHMITZ et al, 2011).

1.6 Prevenção e controle

A transmissão do vírus da dengue poderia ser evitada com êxito pelo controle de populações dos vetores. Em 1920, tanto a dengue quanto outras arboviroses foram controladas de maneira eficaz nas Américas, pela erradicação do vetor *Aedes* (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Atualmente, no entanto, o controle da dengue é uma atividade complexa, pois envolve outros fatores externos ao setor da saúde que determinam a manutenção e dispersão da doença e do vetor transmissor, como os aglomerados urbanos, condições de habitação inadequada, irregularidade no abastecimento de água, o destino impróprio de resíduos, o trânsito de pessoas e cargas entre países e as mudanças climáticas ocasionadas pelo aquecimento global.

Vários métodos de controle do *Aedes* podem ser utilizados rotineiramente. Os métodos mais utilizados são: controle mecânico, biológico e químico. O controle mecânico consiste na adoção de práticas que impedem a procriação do *Aedes* por meio de atividades que destroem ou destinam adequadamente os criadouros: a coleta de resíduos sólidos e a vedação de depósitos de armazenamento de água. O controle biológico pode ser realizado por meio de agentes biológicos larvicidas como o uso de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). O controle químico consiste no uso de substâncias químicas inseticidas para o controle do vetor na fase larvária e adulta, o uso

deve ocorrer de maneira racional e segura para evitar os impactos ambientais destes produtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.7 Tratamento

Não há tratamento específico para a infecção, ou seja, uma terapia antiviral específica para a dengue (GUZMAN et al, 2010). O manejo compreende somente cuidados de suporte, com a infusão de fluidos durante a fase crítica, com monitoramento contínuo (RAJAPAKSE; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2012).

Em crianças os cuidados de suporte incluem: hidratação oral com soro de reidratação oral ou líquidos caseiros tais como água, sucos de frutas naturais, chás e água de coco. No adulto o volume de líquido ingerido deve ser de 80ml/kg/dia sendo $\frac{1}{3}$ com solução salina e os $\frac{2}{3}$ restantes de líquidos caseiros (água, suco de frutas, soro caseiro, chás, água de coco).

Em pacientes sintomáticos com febre elevada e dor deve-se administrar antitérmicos e analgésicos (Dipirona e Paracetamol). Os salicatos, como ácido acetilsalicílico (AAS) são contra indicados em todos os casos, pois podem causar ou agravar os sangramentos. Assim como anti-inflamatórios não-hormonais (Cetoprofeno, Ibuprofeno, Diclofenaco, Nimesulida e outros) e as drogas com potencial hemorrágico.

Em caso de náusea e vômito deve-se administrar antieméticos (Bromoprida e Metoclopramida). Em caso de prurido, alguns medicamentos antipruriginosos (anti-histamínicos e antialérgicos) de uso sistêmico podem ser administrados no adulto como: Dexclorfeniramina, Cetirizina, Loratadina, Hidroxizina e na criança: Loratadina.

Pacientes com sinais de alarme característicos de DHF devem ser acompanhados no leito de internação por um período mínimo de 48 horas com reposição volêmica: hidratação intravenosa imediata: 20ml/kg/h em duas horas com soro fisiológico ou Ringer Lactato.

Pacientes com sinais de choque, desconforto respiratório ou disfunção grave dos órgãos característico de DHF/DSS devem ser acompanhados no leito de terapia intensiva com reposição volêmica parenteral com solução salina isotônica: 20ml/kg em até 20 minutos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

1.8 Vacinas

Até o presente momento, nenhuma vacina eficaz foi desenvolvida. A vacina contra o vírus da dengue deve conferir imunidade protetora simultaneamente para os quatro sorotipos. As abordagens atuais tentam desenvolver quatro vacinas monovalentes e misturá-las para produção de uma vacina tetravalente, no entanto, tal abordagem leva a restrições de produção e formulação (RAVIPRAKASH, 2008).

Diversos grupos de pesquisa estão trabalhando no desenvolvimento de vacinas da dengue utilizando distintas tecnologias de produção de vacina: vírus atenuado vivo (LAV do

inglês ‘live attenuated virus’), vírus inativado purificado (PIV do inglês ‘purified inactivated virus’), subunidades recombinantes, VLPs (do inglês ‘virus-like particle’), vetor ou plasmídeo viral e vacina de DNA. Cada tecnologia possui suas vantagens e seus desafios (SCHMITZ et al, 2011).

Vacinas de LAV são robustas, duradouras e conferem imunidade humoral e celular, possuem baixo custo de produção quando comparado às outras tecnologias e replicam bem em cultura de células, facilitando a produção, no entanto, há dificuldade para atingir o ponto de atenuação com balanço ótimo entre baixa reatividade (para evitar sintomas clínicos de dengue) e imunogenicidade suficientemente alta. A primeira vacina tetravalente de dengue foi produzida com LAV e representa a maioria dos candidatos à vacina em avaliação por testes clínicos. Uma de suas principais preocupações é a estabilidade genética de LAV incluindo a possibilidade de reversão para um fenótipo mais virulento e o risco teórico de recombinação entre a vacina e o vírus selvagem (BHAMARAPRAVATI; SUTEE, 2000). A LAV tetravalente quimérica dengue-febre amarela 17D produzida em células VERO desenvolvida pela indústria de imunobiológicos Sanofi Pasteur estava em estudo de fase III, considerada a vacina em estágio mais avançado e com promessa para lançamento comercial, ao ser testada em escolas na Tailândia apresentou uma eficácia de apenas 30,2% (SABCHAREON, 2012).

Vacinas de vírus não vivo possuem vantagens quando comparadas a LAV: redução no potencial para reatividade e melhor adequação para indivíduos imunocomprometidos e desvantagens: a resposta imune a vacinas não vivas tendem a ser menos ampla, potente e duradoura que LAV. Vacinas PIV de DENV são virions selvagens mortos contendo todas as proteínas estruturais e RNA viral, permitindo a indução da resposta imune às três proteínas estruturais de DENV (LEROUX-ROELS, 2010). As vacinas de PIV estão em estágio pré-clínico (SCHMITZ et al, 2011).

Outra vacina de vírus não vivo é a vacina de subunidades recombinantes que expressa antígenos de partículas de DENV, o que permite uma resposta imune dirigida a antígenos com propriedades desejáveis particulares, como a indução de potentes anticorpos neutralizantes. Vacina de subunidades recombinantes tem sido produzida utilizando diversos sistemas de expressão de proteínas heteróloga incluindo: bactérias, leveduras, células de inseto e células de mamífero. A maioria delas expressa a proteína E truncada com o domínio transmembrânico deletado. Apesar da baixa reatividade apresentada e da necessidade de adjuvantes para atingir uma suficiente imunogenicidade (BERNARDO et al, 2008), vários candidatos de vacinas de subunidades recombinantes estão em fase pré-clínica de desenvolvimento e a candidata mais avançada está sendo avaliada em estudos clínicos de fase I (SCHMITZ et al, 2011).

Vacinas de VLP são partículas que não possuem material genético replicativo, mas incorporam características imunológicas chave do vírus que incluem: superfície repetitiva, estrutura de partícula, indução do sistema imune inato por ativação de receptores de

reconhecimento de moléculas padrão associadas a patógenos e indução de resposta por potentes células B e T. São vacinas seguras e eficientes, podem ser produzidas em larga escala e podem apresentar epítomos estranhos ao sistema imune, produzidos por fusão genética ou conjugação química (JENNINGS; BACHMANN, 2008). Várias vacinas de VLP de DENV estão em estágio pré-clínico (SCHMITZ et al, 2011).

Vacinas de DNA e vacinas de vetor viral permitem a expressão de antígenos *in vivo*, geralmente em forma de VLPs de DENV. Uma das vantagens de vacina de DNA é a termoestabilidade que evita a necessidade de refrigeração durante o estoque e transporte das vacinas. No entanto, vacina de DNA apresenta um desafio em termo de escolha da célula e expressão adequada (KUTZLER; WEINER, 2008). Várias candidatas estão em estudo pré-clínico e a vacina de DNA em estágio mais avançado está sendo avaliada em estudos clínicos de fase I (SCHMITZ et al, 2011).

A vacina de vetor viral de dengue é produzida pela expressão dos antígenos de DENV por meio de um vetor viral, comumente vetor de Adenovirus. Esta estratégia permite uma eficiente infecção das células alvo, é segura, fácil de manipular e estocar. Porém, existem algumas preocupações como a pré-existência de imunidade contra o vetor viral que poderia diminuir a eficiência da vacina (RAVIPRAKASH et al, 2008). Várias candidatas estão em estudo pré-clínico incluindo: vetores não-replicativos, vetores com único ciclo e vetores com replicação competente (SCHMITZ et al, 2011).

O desenvolvimento da vacina da dengue possui múltiplos desafios que incluem: a necessidade de uma imunidade duradoura contra os quatro sorotipos de DENV, a incerteza a cerca da proteção de correlatos imune, o potencial de surgimento da doença por ADE imunológico e a falta de um modelo animal adequado para estudos. Portanto, apesar de haver grande número de candidatos à vacina de dengue em estágio pré-clínico de desenvolvimento (Tabela 1), a comercialização de uma vacina segura e eficaz, ao que tudo indica, irá demandar tempo e novos estudos (SCHMITZ et al, 2011).

Tabela 1. Candidatos à vacina da dengue em estágio pré-clínico de desenvolvimento.

Tecnologia da vacina	Pesquisadores	Valência da vacina	Etapas de desenvolvimento
Subunidade recombinante	IPK/CIGB	Monovalente	Teste em NHPs
	Vaxinnate	Bivalente	Teste em camundongo
	ICGEB	Tetravalente	
	NHRI		
Vacina de DNA	Inovio Pharmaceuticals	Tetravalente	Teste em NHPs
	NMRC		
	CDC		
	Kobe University		Teste em camundongo
VLP	Cytos Biotechnology	Tetravalente	Teste em camundongo
	Kobe University	Monovalente	
	ICGEB		-
Vetor viral	ICGEB	Tetravalente	Teste em camundongo
	GenPhar/NMRC		Teste em NHPs
	Themis Bioscience/ Institut Pasteur		
	UNC	Monovalente	Teste em camundongo
	UTMB		
PIV	NMRC	Monovalente	Teste em NHPs
	GSK/WRAIR/FIOCRUZ	Tetravalente	
LAV	FIOCRUZ	Monovalente	Teste em NHPs
	Chiang Mai University/Mahidol		Teste em camundongo

¹Abreviações: CDC: Centers for Disease Control and Prevention, USA; CIGB: Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Cuba; FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz, Brasil; GSK: GlaxoSmithKline Biologicals; ICGEB: International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, India; IPK: Pedro Kourí Tropical Medicine Institute, Cuba; NHPs: Primatas não humanos; NHRI: National Health Research Institutes, Taiwan; NMRC: Naval Medical Research Center, USA; NSTDA: National Science and Technology Development Agency, Thailand; UNC: University of North Carolina at Chapel Hill, USA; UTMB: University of Texas Medical Branch, USA; WRAIR: Walter Reed Army Institute of Research, USA. (Adaptado de SCHMITZ et al, 2011) Com permissão.

1.9 Estrutura molecular do vírus da dengue

O genoma viral de DENV é formado por RNA fita simples senso positivo (ssRNA+) com cerca de 10-12kb, envolvido por um nucleocapsídeo icosaédrico com cerca de 30nm de diâmetro. O nucleocapsídeo é coberto por um envelope lipídico de 10nm formando o virion que possui cerca de 50nm de diâmetro (RUSSELL, 1980 apud TANG; OOI, 2012).

A única ORF (do inglês ‘open reading frame’ ou sequência de leitura aberta) de DENV é flanqueada por uma região 5’ *cap* UTR (do inglês ‘untranslated region’ ou região não traduzida) e 3’ UTR sem calda poli-A (GUBLER, 1998). O genoma viral é traduzido em uma única poliproteína constituído por regiões que codificam três proteínas estruturais: C, M (pr-M) e E, e sete proteínas não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Esta poliproteína é clivada por proteases virais e do hospedeiro durante ou após a tradução (RICE et al, 1985 apud HENCHAL; PUTNAK, 1990) (Figura 3).

O virion maduro contém três proteínas estruturais: Proteína C também chamada proteína do core ou nucleocapsídeo, proteína M ou proteína associada à membrana e proteína E ou proteína do envelope (RICE et al, 1985 apud HENCHAL e PUTNAK, 1990) (Figura 4).

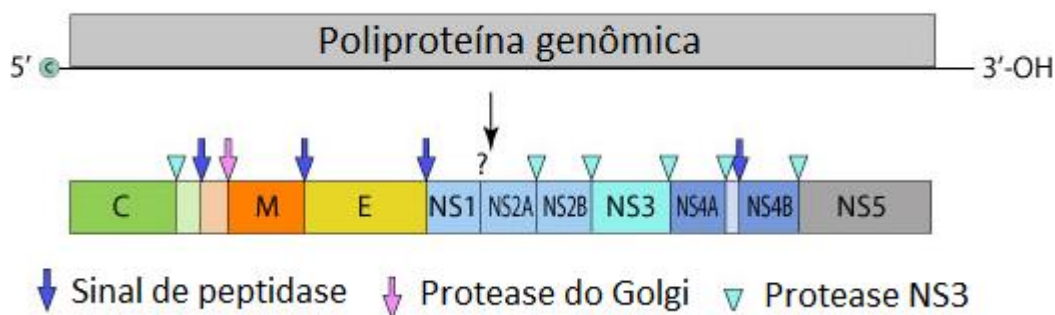


Figura 3. RNA genômico dos *Flaviviridae*, linear, ssRNA(+) com cerca de 10-12kb codificando uma única ORF clivada e traduzida em três proteínas estruturais (C, M e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). A extremidade 3’ não é poliadenilada e a extremidade 5’ possui *cap* metilado que permite a tradução proteica. (Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/24.html> Acesso em: fev. 2013). Cistron e clivagem da poliproteína do DENV. C = proteína do “core”, M = membrana, E = envelope, NS = proteínas não-estruturais.

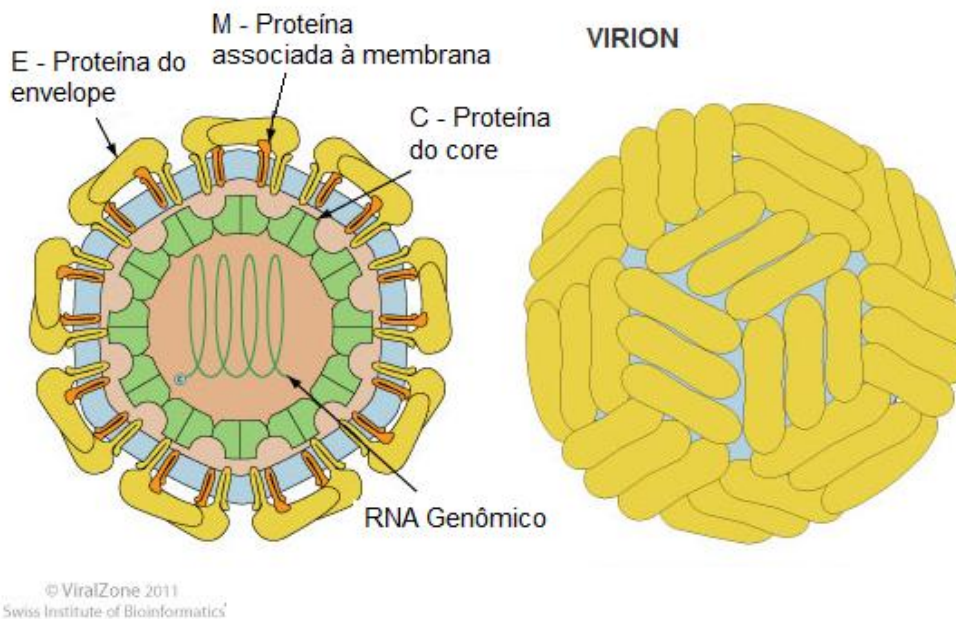


Figura 4. Estrutura da partícula de DENV e proteínas estruturais pertencentes ao vírion. (Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/24.html> Acesso em: fev. 2013).

A proteína E, localizada nas espículas do envelope dos DENV, é fundamental para a ligação viral ao receptor de membrana. A estrutura tridimensional da proteína E consiste de um complexo dimérico com duas subunidades idênticas. A proteína E é subdividida em três regiões distintas: I, região central da molécula, contendo o radical amina terminal; II, contém a maior parte dos contatos do dímero; III, inclui o C terminal e tem relação com a virulência de determinadas cepas virais (FIGUEIREDO, 1999).

A proteína C é a primeira proteína sintetizada durante a tradução e possui massa molecular de 13,5kDa (KAROKA, 2007).

A proteína M é a uma pequena proteína não-glicosilada, com apenas 8kDa, formada após clivagem proteolítica do precursor glicosilado prM durante a maturação da partícula viral. A formação de M a partir de pré-M parece ser crucial na morfogênese viral, aumentando a infectividade do vírus, no entanto, o papel da proteína M na maturação viral ainda é desconhecido (KAROKA, 2007).

A segunda maior proteína viral NS3 tem três funções principais: atividade de protease, trifosfatase e helicase. A proteína NS5 é a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), localizada no citoplasma e associada à membrana e parte de NS5 atua como uma metiltransferase no *capping* do genoma viral. As pequenas proteínas hidrofóbicas NS2a, NS2b, NS4a, NS4b são associadas a membrana, acredita-se que formam componentes da membrana do complexo viral de replicação e podem estar envolvidas na localização na membrana de NS3 e NS5 pela interação proteína-proteína (KORAKA, 2007). Além disso, a proteína NS2a foi associada a processos proteolíticos de NS1. As regiões 5' e 3' UTR de DENV foram associadas

à replicação viral, tradução proteica e virulência. A importância de 5' e 3' UTR no ciclo viral foi associada a elementos estruturais conservados em todos os *Flavivirus* independente da homologia de sequências (MAIRIANG et al, 2013).

1.10 A proteína não-estrutural 1 (NS1)

A proteína não-estrutural 1 (NS1) é uma glicoproteína com cerca de 46 a 55 kDa, dependendo do seu estado de glicosilação. Possui múltiplas formas oligoméricas, pode ser secretada como lipopartícula hexamérica no meio extracelular (sNS1) ou pode estar associada à membrana (mNS1) tanto na superfície celular, quanto em associação com compartimentos vesiculares intracelulares induzidos pelo vírus (MULLER; YOUNG, 2013). NS1 não faz parte do virion. (WANG; SEKARAN, 2010).

Dentre os flavivírus, a proteína NS1 possui alta identidade de nucleotídeos e aminoácidos, o gene possui 1056 nucleotídeos codificados em uma poliproteína com 352 aminoácidos (WANG; SEKARAN, 2010).

Em 1970, NS1 foi primeiramente descrita como antígeno solúvel na fixação do complemento (do inglês *soluble complement-fixing antigen*, SCF) em cultura de células infectadas, chamada de gp48 devido a seu peso molecular, mas foi renomeada devido à homologia de sequência com a NS1 de Febre Amarela (YOUNG et al, 2000).

A NS1 é inicialmente translocada no retículo endoplasmático rugoso, como uma glicoproteína hidrofílica, solúvel em água e monomérica, pouco tempo depois, forma um homodímero ligado de forma não covalente, que é mais hidrofílico que o monômero, em seguida é rapidamente dimerizada. O dímero formado é então transportado para o complexo de Golgi e dois dos quatro peptídeoglicanos ligados à extremidade amino-terminal são modificados. Nessa fase a NS1 pode permanecer dentro da célula e ser transportada para a membrana ou pode ser secretada, no entanto, esta secreção em grande quantidade é restrita a células de mamífero infectadas, não ocorre em células de inseto (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

A ligação de NS1 com uma grande variedade de células foi atribuída a interação de suas cargas com glicosaminoglicanos (GAG), sulfato de heparina e sulfato de condroitina E, apesar da sequência de aminoácidos de NS1 não apresentar um sítio de ligação a GAG explícito (MULLER; YOUNG, 2013). Em cultura de células, NS1 se liga fortemente a fibroblastos e células epiteliais (com grau de variação em células dérmicas, microvasculares pulmonares e células endoteliais da aorta) (AVIRUTNAN et al, 2007), enquanto que sNS1 demonstrou um tropismo para hepatócitos *in vitro* e *in vivo* (ALCON et al, 2002).

A função de NS1 não está completamente elucidada, no entanto, estudos prévios apresentaram envolvimento dessa proteína na replicação viral, atuando como um co-fator e colocalizando com a forma replicativa viral de RNA fita dupla (dsRNA do inglês '*double-stranded*' RNA) e outros componentes do complexo de replicação (AVIRUTNAN et al, 2007). Após a infecção com DENV anticorpos são formados contra NS1 com atividade de fixação do

complemento, já que tanto sNS1, quanto mNS1 são altamente imunogênicas (MARTINA; KAROKA; OSTERHAUS, 2009). A proteína NS1 também pode ser detectada em amostras de sangue de pacientes com infecção primária ou secundária na fase aguda (WANG; SEKARAN, 2010), sugerindo um envolvimento dessa proteína na patogênese viral da dengue e possibilitando o uso da proteína como um possível marcador de infecção do DENV (WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

Outra hipótese é que NS1 auxilia na morfogênese do vírus e sua importância imunológica pode estar relacionada às proteínas expressas na superfície de células infectadas se tornarem alvo de citólise imunológica (destruição de células mediadas por anticorpos específicos, ativadas pelo sistema complemento, resultando na ruptura da membrana celular) (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

O nível elevado de NS1 secretado no soro de pacientes infectados com DENV está em muitos casos relacionado com a evolução do quadro para dengue hemorrágica. Estudo prévio demonstrou que NS1 pode se ligar a trombina e formar um complexo NS1/trombina em soro de pacientes infectados. A trombina é uma proteína com papel fundamental no processo de coagulação, já que converte fibrinogênio em fibrina, portanto, este estudo leva a indícios que NS1 pode contribuir para o surgimento de hemorragias em pacientes com DHF (LIN et al, 2012).

NS1 demonstrou possuir reatividade cruzada a epítopos que são comuns a um grande número de componentes celulares do hospedeiro e acredita-se que em infecções secundárias os anticorpos induzidos por estes determinantes contribuem para os danos celulares em plaquetas e células endoteliais que levam a permeabilidade vascular característico de DHF/DSS grave (MULLER; YOUNG, 2013).

1.10.1 Peptídeo imunogênico de NS1

Em pesquisas prévias de Mason et al, 1990 foram detectados múltiplos determinantes antigênicos no segmento de NS1 de DENV-1 entre os resíduos de aminoácidos 57 a 126. Após testar anticorpos monoclonais previamente construídos contra diversas regiões de NS1, notou-se que dois deles reagiram em sítios entre os aminoácidos 57 a 103. Analisando a sequência encontrada alinhada com sequências de outros *Flavivirus*, foi visto que a região antigênica com 68 aminoácidos (57 a 126) não é altamente conservada, no entanto, 15 dos 68 aminoácidos são idênticos aos aminoácidos da sequência de NS1 de DENV-1, JEV, 'Valley encephalitis' (MVE), 'St. Louis encephalitis' (SLE), WNV e YFV, portanto esta região possui características importantes (MASON et al, 1990).

Em outros trabalhos, antígenos virais foram expressos em *E.coli* para estudar as estruturas antigênicas da proteína NS1 de DENV-2. Estes estudos mostraram que um anticorpo policlonal anti-DENV-2 era fortemente reativo contra uma proteína fusionada contendo

sequências da região N-terminal da proteína NS1 de DENV-2 (PUTNAK et al, 1988 apud MASON et al, 1990).

1.11 Ciclo de infecção celular viral

No momento que o mosquito pica o humano suscetível, o DENV além de ser injetado na corrente sanguínea, atinge também a epiderme e a derme, resultando na infecção de células dendríticas (DC do inglês ‘Dendritic cells’) de Langerhans (DC epidermais) e queratinócitos. Como resultado da viremia primária, algumas células de linhagem mononuclear incluindo monócitos derivados do sangue, macrófagos do fígado e do baço são infectados. (MARTINA; KAROKA; OSTERHAUS, 2009).

As células infectadas migram do sítio de infecção para os linfonodos, que recrutam macrófagos e monócitos, os quais tornam-se alvo de infecção (MARTINA; KAROKA; OSTERHAUS, 2009), sabe-se que os DENV têm tropismo por essas células fagocitárias, que são os maiores sítios de replicação viral (LEI et al, 2001). Conseqüentemente, a infecção é amplificada e o vírus é disseminado no sistema linfático.

DENV entra na célula por endocitose mediada por receptor e no endossomo ocorre a fusão induzida por pH ácido (HEINZ; STIASNY, 2012) (Figura 5). O ssRNA, utilizado diretamente como RNA mensageiro (mRNA), é traduzido em uma única poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais. Estas proteínas são essenciais para o processamento da poliproteína e para a replicação do RNA que ocorre no citoplasma (HO et al, 2001).

A montagem da partícula viral, neste estágio chamada partícula imatura não infecciosa, ocorre no retículo endoplasmático, em seguida, é transportada para o Complexo de Golgi na região trans (TGN do inglês ‘trans-Golgi network’) no qual o pH ácido irá causar o rearranjo das proteínas do envelope e a clivagem proteolítica de prM em pr e M pela protease celular Furina, chamado maturação viral. Por fim, irá ocorrer o transporte do vírion infeccioso para fora da célula por via exocítica (exocitose). O fragmento pr continua associado a partícula e é liberada durante a exocitose, a NS1 é a única proteína não-estrutural que é secretada de células infectadas (HEINZ; STIASNY, 2012) (Figura 5).

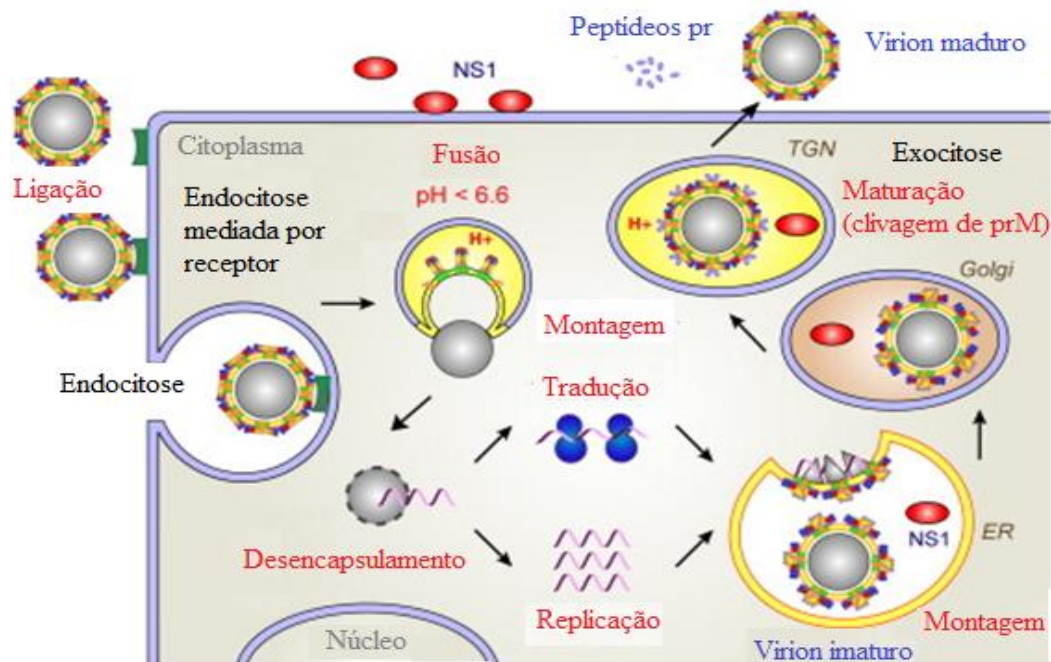


Figura 5. Esquema adaptado do ciclo de infecção celular viral dos flavivirus (HEINZ e STIASNY, 2012) Com permissão.

1.12 Diagnóstico de Dengue

Para que haja um diagnóstico positivo de infecção por DENV, este deve ser identificado por isolamento viral ou deve haver um aumento de quatro vezes no título de anticorpo específico no soro de pacientes em fase aguda ou convalescente. Os métodos utilizados em laboratórios de diagnóstico incluem: detecção do vírus através de cultura de célula ou imunofluorescência; detecção do antígeno viral por ELISA (do inglês *'Enzyme-linked Immunosorbent Assay'*); detecção de anticorpo anti-DENV por HI – inibição de hemaglutinação; CF – teste de fixação de complemento; teste de neutralização; ELISA e detecção do ácido nucléico viral por RT-PCR (do inglês *'Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction'*, reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa) ou RT-qPCR (do inglês *'Quantitative Real Time'* PCR, PCR em tempo real) (WANG; SEKARAN, 2010).

1.12.1 Isolamento viral

A viremia da dengue pode ser detectada do segundo para o terceiro dia, após o início da febre, em infecções primárias e do quarto ou quinto dia em infecções secundárias. Durante o período da viremia, sangue, soro ou plasma podem ser usados para o isolamento viral (TANG; OOI, 2012).

A inoculação intratorácica em mosquito ainda é o método mais sensível de isolamento do vírus, a taxa de isolamento para os quatro sorotipos de DENV pode chegar a 71,5-84,2%. Várias espécies de mosquito podem ser utilizadas e são sensíveis ao isolamento viral incluindo *A. aegypti*, *A. albopictus*, *Toxorhynchites splendens* e *T. splendens*, tanto mosquitos machos quanto fêmeas são suscetíveis. O vírus se replica em vários tecidos do mosquito, inclusive o cérebro, atingindo altos títulos (10^6 a 10^7 MID₅₀) em quatro ou cinco dias. Muitas cepas endêmicas podem ser isoladas apenas por este método, a técnica é trabalhosa e requer a manutenção de um insetário. Se houver falha de segurança, os mosquitos inoculados podem infectar os pesquisadores, este perigo é minimizado pela inoculação exclusiva de mosquitos machos, que não picam. Ao final de 14 dias, os vírus são detectados pelo emprego de imunofluorescência indireta (IFI) ou direta (IFD) (GUZMÁN, KOURI, 2002).

O isolamento viral também pode ser realizado através do inóculo de DENV no cérebro de camundongos. Geralmente, camundongos de 2 a 4 dias de idade sofrem inoculação intracerebral com soro ou plasma, seguida do sacrifício dos mesmos e coleta do isolado (JARMAN; NISALAK; ANDERSON, 2011). Este método é demorado, trabalhoso, caro e tem baixa sensibilidade, não sendo capaz de isolar muitas cepas endêmicas. Algumas destas cepas requerem múltiplas passagens até se adaptarem ao camundongo. Este método de isolamento foi praticamente abandonado (GUBLER, 1998).

Devido às desvantagens citadas, nem mosquitos nem camundongos são utilizados durante a rotina de diagnóstico. O isolamento em cultura de células é mundialmente utilizado para tal prática. A linhagem celular mais utilizada é a C6/36 derivada de *A. albopictus*. Uma alternativa é a utilização de células de mamífero como Vero, LLC-MK2 ou BHK-21 (KUBERSKI; ROSEN, 1977 apud TANG; OOI, 2012).

Uma das vantagens do isolamento viral é sua utilização não só para fins de diagnóstico, como também para realização de estudos *in vitro* como sequenciamento de genoma, estudos de infecção e neutralização viral, dentre inúmeros outros. O isolamento viral bem sucedido pode ser confirmado e sorotipado por imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais, apresenta alta especificidade e limite de detecção teórico de um único vírus viável, no entanto, na prática a sensibilidade é de aproximadamente 40,5% (TANG; OOI, 2012).

1.12.2 Detecção de RNA viral

A detecção de RNA extraído de sangue, soro ou plasma por RT-PCR é um método rápido, sensível e específico para confirmar a infecção por DENV. Vários oligonucleotídeos iniciadores e protocolos já foram desenvolvidos e validados tanto para RT-PCR quanto para Q-PCR, utilizando SYBR[®] Green como marcador de detecção de fluorescência ou Taqman[®] com sondas oligonucleotídicas marcadas específicas para cada sorotipo, sendo mais sensível (84%),

específica (66%), rápida e com menor custo que o SYBR[®] Green (81% de sensibilidade e 74% de especificidade) (PAUDEL et al, 2011).

Uma nova técnica empregando uma única mistura de reação à temperatura constante NASBA (do inglês ‘*nucleic acid sequence-based amplification*’) mostrou-se com alta sensibilidade (98,5%) e especificidade (100%). NASBA pode ser altamente útil e aplicável durante surtos quando não há quantidade suficiente de termocicladores disponíveis (TANG; OOI, 2012).

A sensibilidade de RT-PCR convencional é de 48,4% a 98,2% e o limite de detecção é de 1 a 50 unidade formadora de placa (UFP). A sensibilidade depende do período de realização do teste que deve coincidir com o período de viremia que dura até 8 dias depois do aparecimento dos sintomas. Um teste de RT-PCR dificilmente terá resultado positivo após o 6º dia do início da doença (CHUA; MUSTAFA; ABDUL, 2011).

RT-qPCR possui sensibilidade de 58,9% a 100% e possui um limite de detecção de 0,1 a 3,0 UFP. A extração de RNA do sangue total é mais sensível (90,0%) quando comparado à extração de soro ou plasma (62,0%) no mesmo *pool* de amostra. RT-qPCR também pode ser utilizado para a detecção de DENV em tecidos, saliva e urina, se a amostra for coletada entre o 6º e 16º dia, após o início da doença, esta possui taxa de detecção de 50% a 80%. No entanto, o nível de RNA viral na urina e saliva (1×10^1 – 5×10^1 UFC/ml) é menor que no soro (7.9×10^2 – 1.9×10^5 UFC/ml) (LEPARC-GOFFART; BARAGATTI; TEMMAM, 2009).

1.12.3 Detecção de anticorpos (IgM e IgG)

O teste de detecção de anticorpos Imunoglobulina M (IgM) e ImunoglobulinaG (IgG) antidengue é o teste de diagnóstico de dengue mais utilizado em todo o mundo (TANG e OOI, 2012). No Brasil, o MAC-ELISA (do inglês ‘IgM antibody capture’) é o teste realizado na rede pública de saúde. Os kits disponíveis podem capturar Ig ou detectar Ig diretamente e podem detectar IgM, IgG ou ambos, por ELISA ou por teste rápido utilizando tiras (Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional> > Acesso em: abr. 2013).

A detecção de IgM ocorre entre o 4º e o 5º dia, após o início da doença. Níveis de IgM continuam a crescer por aproximadamente 2 semanas e podem persistir por cerca de 179 dias em infecção primária e 139 dias em infecção secundária. Estudos multicêntricos testaram dez kits de IgM concluíram que detecção por ELISA tem uma maior sensibilidade (61,5% a 99%), quando comparada a detecção com teste rápido (20,5% a 97,7%) e atribuiu a ampla variação de sensibilidade ao tempo de coleta de amostras (BLACKSELL; JARMAN; BAILEY, 2011).

A resposta precoce de IgM anti-DENV, menor que dois meses, apresentou reação cruzada entre os quatro sorotipos de DENV e entre outros flavivírus, portanto, a epidemiologia da região onde ocorreu a infecção deve ser utilizada no auxílio da interpretação do resultado.

Considerando diagnose precoce, a detecção de IgG não é uma boa ferramenta em infecções primárias, já que esta imunoglobulina só pode ser detectada 10 dias após o início da doença, no entanto, em infecções secundárias há um rápido aumento dos níveis de IgG quatro dias após o início da doença favorecendo a diagnose quando utilizada a proporção de IgM e IgG (PRINCE; YEH; LAPÉ-NIXON, 2008).

1.12.4 Detecção de anticorpos neutralizantes

Anticorpos neutralizantes inibem a infecção por DENV e possuem alta especificidade na distinção de anticorpos anti-DENV dos anticorpos contra outros flavivirus. Estes anticorpos podem ser mensurados utilizando testes de neutralização por redução de placa (do inglês 'plaque reduction neutralizing tests'; PRNTs), que é baseado na quantificação do título de anticorpos neutralizantes contra o vírus. Apesar de ser amplamente utilizado em estudos imunológicos, é uma técnica que demanda tempo, é trabalhosa e possui baixa produção, por consequência, não é utilizado para o diagnóstico de rotina do DENV (RUSSELL et al, 1967 apud TANG; OOI, 2012).

1.12.5 Detecção de antígeno

ELISA direto contra NS1 demonstrou que este antígeno está presente em altas concentrações no soro de pacientes infectados com DENV durante a fase inicial da doença (ALCON et al, 2002), havendo uma relação entre o nível de NS1, o título na viremia e a severidade da doença (LIBRATY et al, 2002) (Figura 6).

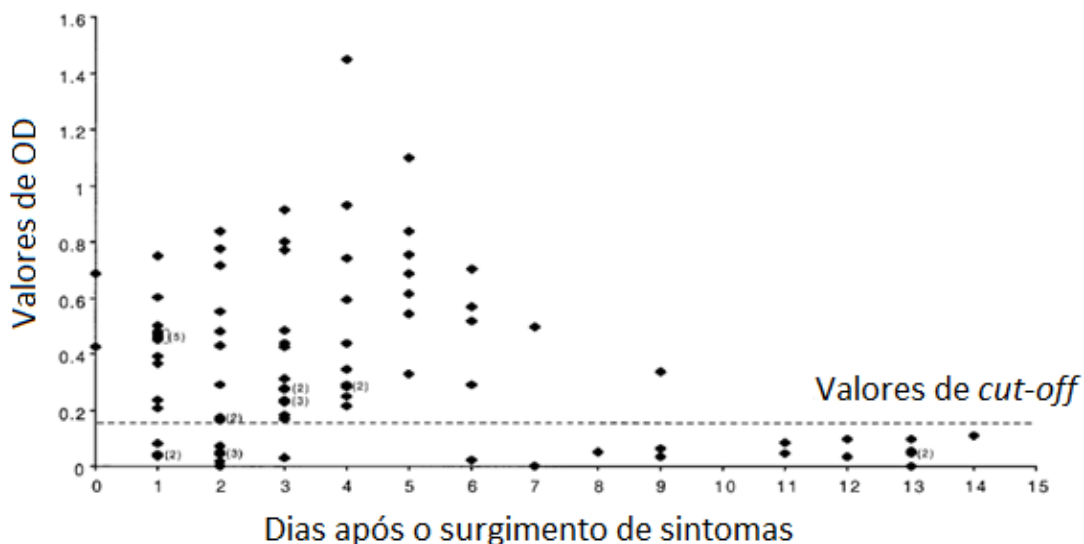


Figura 6. Captura de antígeno de NS1 no soro de pacientes infectados com DENV1. Eixo Y - OD do soro testado de pacientes diluído 1:10. Eixo X - Dias após o início da febre (ALCON et al, 2002) Com permissão.

Como a proteína NS1 é produzida em grandes quantidades durante a replicação do DENV, sua detecção pode ser realizada logo no primeiro dia que o paciente apresenta o quadro febril (PEELING, 2010). Um teste ELISA de captura de NS1 para DENV revelou que NS1 é secretada desde o aparecimento dos sintomas em alguns indivíduos infectados em altos níveis, chegando a 50µg/ml (YOUNG et al, 2000). Este fato torna a proteína NS1 um marcador ideal de diagnóstico e apresenta uma enorme vantagem, quando comparada aos métodos indireto de detecção de anticorpos (IgM e IgG), já que os anticorpos só serão produzidos após a diminuição dos níveis virais, geralmente cinco dias após o início dos sintomas, ou seja, em um estágio tardio da doença, inviabilizando o diagnóstico precoce (PEELING, 2010) (Figura 7).

Estudos recentes demonstraram que níveis elevados de NS1 detectados precocemente em pacientes infectados com DENV podem estar relacionados ao início de dengue grave (DHF/DSS), portanto, NS1 poderia ser caracterizada como biomarcador precoce para prognóstico de dengue grave (AVIRUTNAN et al, 2006).

Além da detecção da própria NS1, anticorpos anti-NS1 elicitados pela proteína NS1, também têm sido utilizados no desenvolvimento de testes de diagnóstico. A especificidade da resposta do anticorpo levou ao desenvolvimento de testes de ELISA capazes de determinar o sorotipo infectante, se a infecção é primária ou secundária e a diferenciação da infecção de DENV com JEV em alguns países do sudeste da Ásia. Ademais dos testes em humanos, tiras de teste rápido de NS1 foram aplicadas para detecção de DENV em mosquitos (MULLER; YOUNG, 2013).

As vantagens dos testes ELISA e ICTs (testes de imunocromatografia, também chamadas tiras de teste rápido) de captura do antígeno NS1 são: rapidez, baixo custo e facilidade no manuseio pelo técnico que executa o teste, quando comparados aos testes moleculares e imunocitoquímicos. Outra importante vantagem é a possibilidade do diagnóstico clínico/patológico *postmortem* em casos fatais nos tecidos de fígado, pulmão, rim, cérebro, baço e timo (LIMA et al, 2011).

A aplicação e o desenvolvimento comercial da detecção de NS1 com fins diagnósticos revolucionou a diagnose de dengue e possibilitou um método simples a um custo relativamente baixo, com alta sensibilidade e especificidade (MULLER; YOUNG, 2013).

Diversos trabalhos foram publicados com o intuito de comparar a sensibilidade, especificidade, reatividade cruzada, entre outros fatores dos kits comerciais de detecção de NS1 de DENV: Pan-E Dengue Early ELISA from Panbio (Brisbane, Australia), Platelia Dengue NS1 AG from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) e Standard Diagnostics dengue virus NS1 antigen ELISA (Standard Diagnostics, South Korea) presentes atualmente no mercado mundial, (BLACKSELL et al, 2012; BLACKSELL et al, 2011; GUZMAN et al, 2010; LIMA et al, 2010), outros trabalhos compararam os kits de detecção de NS1 com outros métodos como uma nova técnica de RT-PCR e detecção de IgM e IgG (HUHTAMO et al, 2009) e encontraram sensibilidade variando de 44,8% a 83,6% (Tabela 2) e especificidade na margem de 92,5% a 100% (Tabela 3).

Tabela 2. Sensibilidade dos kits de detecção de NS1 de DENV: Pan-E Dengue Early ELISA from Panbio (Brisbane, Australia), Platelia Dengue NS1 AG from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) e Standard Diagnostics dengue virus NS1 antigen ELISA (Standard Diagnostics, South Korea) nos seguintes trabalhos:

Referências	Sensibilidade		
	Pan-E –Panbio	Platelia - BioRad	Standard Diagnostics
Guzman et al, 2010	52% (24%-72%) 444/854	66% (34–76%) 847/1284	-
Blacksell et al, 2012	44,8% (38-51%) 107/239	56,2% (50-63%) 134/239	55,2% (49-62%) 131/239
Blacksell et al, 2011	58,6% (48,2-68,4%) 58/99	58,6% (48,2-68,4%) 58/99	48,5% (38,5-58,7%) 48/99
Lima et al, 2010	72,3% 159/220	83,6% 184/220	-
Wang, Sekaran, 2010	-	-	76,76% 142/185
Huhtamo et al, 2009	-	67,3% 66/98	-

Tabela 3. Especificidade dos kits de detecção de NS1 de DENV: Pan-E Dengue Early ELISA from Panbio (Brisbane, Australia), Platelia Dengue NS1 AG from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) e Standard Diagnostics dengue virus NS1 antigen ELISA (Standard Diagnostics, South Korea) nos seguintes trabalhos:

Referências	Especificidade		
	Pan-E –Panbio	Platelia - BioRad	Standard Diagnostics
Guzman et al, 2010	90%	100%	-
Blacksell et al, 2012	93,5%	100%	98,6%
Blacksell et al, 2011	92,5%	98,8%	99,4%
Lima et al, 2010	100%	98,7%	-
Wang, Sekaran, 2010	-	-	98,31%
Huhtamo et al, 2009	-	100%	-

1.13 Cenário atual da Dengue no Brasil

Como base nos estudos previamente apontados, fica claro a alta magnitude e transcendência e da Dengue, uma doença com grande importância epidemiológica, grave evolução do quadro clínico, sem tratamento eficaz, com difícil controle do vetor de transmissão e candidatos à vacina ainda em estágio pré-clínico de desenvolvimento.

Em 2006 o grupo de cientistas que trabalham com Dengue (‘Dengue Scientific Working Group’) liderado pelo Programa Especial para Pesquisas e Treinamentos de Doenças Tropicais da OMS (‘World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases’, WHO/TDR) estabeleceu prioridades para as pesquisas que tem como objetivo o tratamento, a prevenção e o controle da dengue. A avaliação e o desenvolvimento de novas propostas de diagnóstico estavam incluídos nas prioridades propostas. (FARRAR et al, 2009; KROEGER, NATHAN, 2006).

Diante do cenário apresentado, um método de diagnóstico precoce, eficaz e de baixo custo é uma importante medida que tornaria possível uma rápida intervenção do Estado por meio de políticas de saúde pública, prevenindo a dispersão das infecções por DENV e permitindo a orientação aos pacientes a um tratamento médico adequado, com redução dos custos (CUZZUBBO et al, 2001).

O método de diagnóstico atual disponibilizado na rede pública de saúde do país: MAC-ELISA não é capaz de detectar IgM nos três primeiros dias de sintoma da doença (Figura 7) (BLACKSELL et al, 2011; LIMA et al, 2011) e os kits comerciais de detecção de NS1 de

DENV: Pan-E Dengue Early ELISA from Panbio (Brisbane, Australia), Platelia Dengue NS1 AG from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) e Standard Diagnostics dengue virus NS1 antigen ELISA (Standard Diagnostics, South Korea) presentes atualmente no mercado mundial possuem baixa sensibilidade: 44,8%-83,6% segundo resultados dos trabalhos de diversos grupos de pesquisa (BLACKSELL et al, 2012; BLACKSELL et al, 2011; GUZMAN et al, 2010; LIMA et al, 2010; HUHTAMO et al, 2009, WANG, SEKARAN, 2010).

Devido a todos os dados apontados, faz-se necessário à busca de um teste de diagnóstico que seja capaz de atender a esta lacuna. Ainda há, portanto, uma demanda para a introdução de um método de diagnóstico precoce, nacional e com maior especificidade.

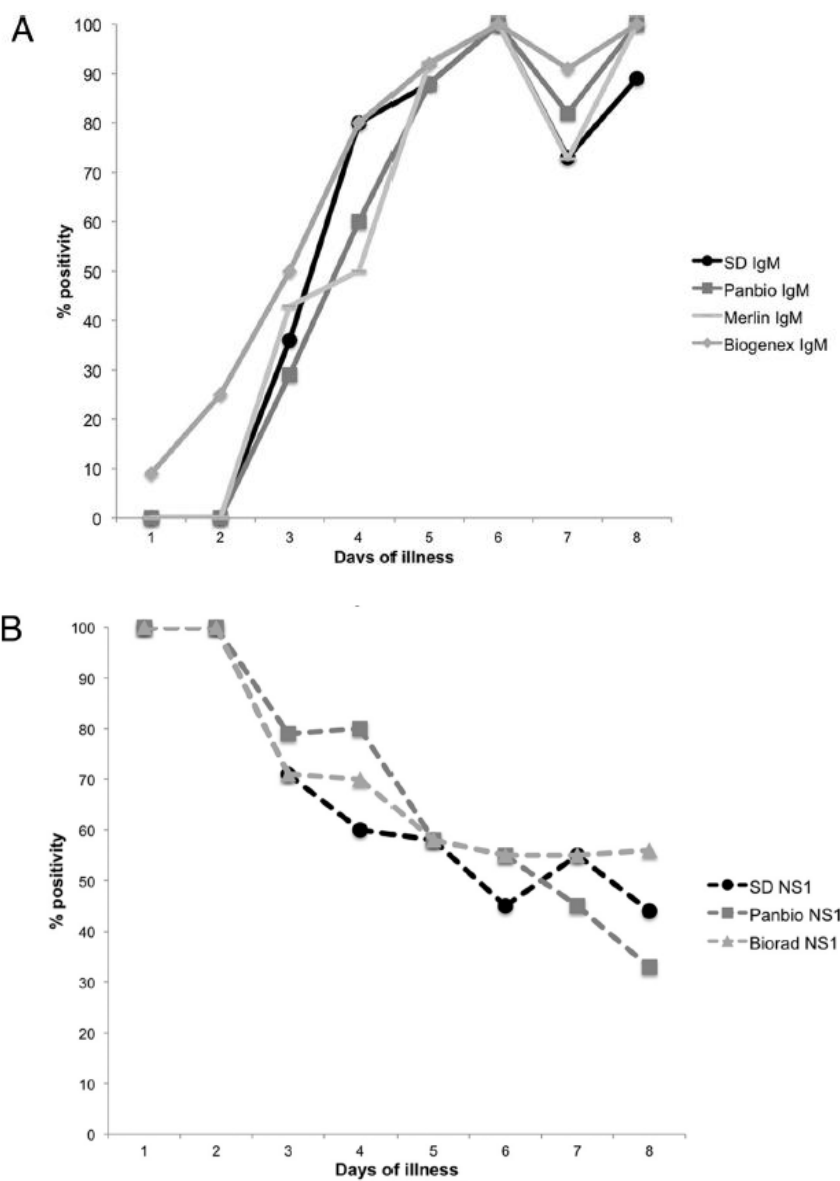


Figura 7. Gráfico de detecção de IgM (A) e NS1 (B) por kits comerciais: Standard Diagnostics, Pan-E - Panbio, Merlin e Biogenex. Eixo X - % de positividade. Eixo Y - Dias de doença. (BLACKSELL et al, 2011). Com permissão.

1.14 ELISA Direto e Indireto

O ELISA é um teste imunoenzimático de diagnóstico baseado na interação antígeno-anticorpo. O ELISA indireto visa a detecção de anticorpos específicos contra o antígeno sensibilizado na placa, já o ELISA direto, também chamado “sanduiche”, detecta o próprio antígeno presente na amostra testada, através da sensibilização do anticorpo específico na placa. (Disponível em: <http://www.epitomics.com/products/product_info/1257, http://www.leinco.com/indirect_elisa > Acesso em: fev. 2013). (Figura 8).

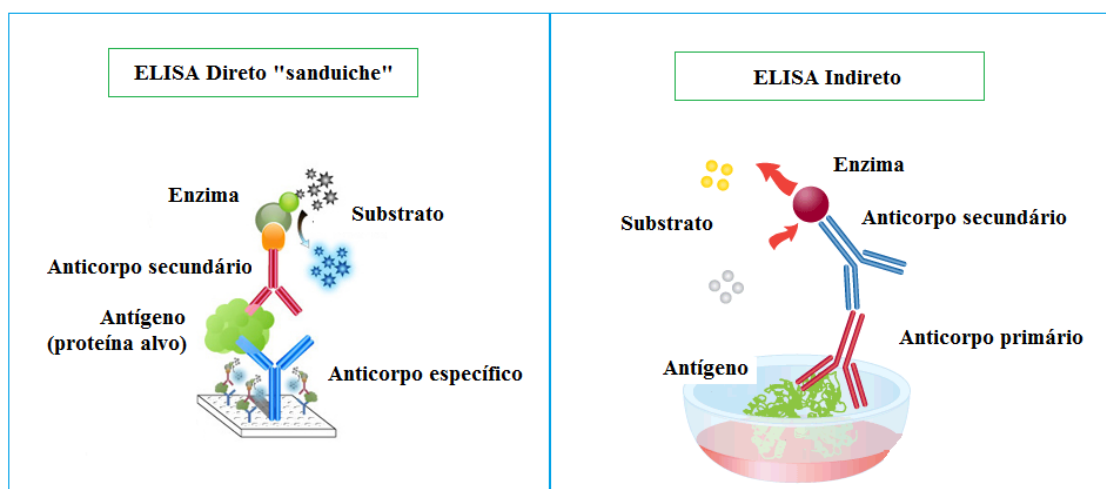


Figura 8. Esquemática dos ensaios imunoenzimáticos de diagnóstico: ELISA Direto e Indireto. (Disponível em: <http://www.epitomics.com/products/product_info/1257, http://www.leinco.com/indirect_elisa >, adaptados. Acesso em: fev. 2013).

1.15 Expressão de proteínas heterólogas

Existem diversos sistemas funcionais e/ou comerciais de expressão de proteínas recombinantes e a escolha de cada sistema vai depender da finalidade almejada para a proteína de interesse. O rendimento e a atividade biológica da proteína recombinante são diferentes para cada sistema e dependem de diversos fatores como solubilidade, estabilidade e tamanho da proteína. Cada proteína apresenta problemas particulares de expressão devido a sequencia única de aminoácidos para cada proteína.

A expressão proteica em *E.coli* tem como vantagem a habilidade de produção de proteínas heterólogas em grande quantidade. O rápido crescimento bacteriano quando comparado a células de mamíferos, permitindo a purificação e análise de expressão em um menor tempo. No entanto, bactérias não são capazes de glicolisar proteínas e realizar demais modificações pós-traducionais.

Leveduras apresentam avançadas vias de dobramento para proteínas heterólogas. Quando as sequências de sinalização são utilizadas, a levedura é capaz de processar e secretar a proteína corretamente dobrada. Outra vantagem é rápido crescimento das leveduras em um meio simples de cultura, diminuindo o custo de produção. A tecnologia de fermentação é amplamente utilizada para a expressão de proteínas de interesse clínico e industrial. Apresenta como desvantagem a incapacidade de glicosilar proteínas animais corretamente, realiza em alguns casos hiperglicosilação pela expressão por *Saccharomyces cerevisiae* e degradação eventual de proteínas recombinantes pela expressão por *Pichia pastoris*.

A grande vantagem da expressão proteica em células de mamífero é que a sinalização, o processamento e a secreção de proteínas eucarióticas é corretamente e eficientemente reconhecidas pelas células de mamífero. No entanto, essa é uma abordagem com elevado custo atribuído aos meios de cultivos e apresenta como dificuldades a manutenção das células relacionadas a oxigenação, acúmulo de dióxido de carbono e estabilidade da linhagem celular.

A expressão proteica em células de inseto mediadas por Baculovírus produz grande quantidade de proteína heteróloga preservando sua atividade funcional. A manutenção das células requer boa qualidade do meio e quantidade suficiente de oxigenação e a desvantagem está relacionada a presença de proteases ou enzimas proteolíticas que podem degradar a proteína de interesse (VERMA; BOLETI; GEORGE, 1998).

1.16 Baculovírus - como vetor de expressão

Baculovírus são vírus em forma de bastão e envelopados (do latim, *baculum*, cano, bengala, bastão), infectam animais da Classe Insecta (INCEOGLU et al, 2001). Estes vírus pertencem à família *Baculoviridae* com genoma na forma de DNA dupla-fita (dsDNA), circular, super-enovelado e com tamanho variando entre 80 e 180 kpb (ROHRMANN, 2011).

Os Baculovírus são utilizados no controle biológico de pragas dos agrossistemas (CASTRO et al, 1999), além disso, são mundialmente utilizados como vetor de expressão de proteínas heterólogas (KOST et al, 2005) e a habilidade de transdução de células de mamífero de espécies como *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) sugere que estes organismos possam ser utilizados como ferramentas em estudos de terapia gênica (HITCHMAN et al, 2011). Atualmente, milhares de proteínas recombinantes, desde enzimas citosólicas a proteínas ligadas à membrana, foram produzidas com sucesso em células de inseto infectadas por baculovírus (KOST et al, 2005).

O sistema de expressão de proteínas heterólogas utilizando baculovírus baseia-se na introdução de genes de interesse, oriundos de outros organismos ou do próprio genoma do baculovírus na região de um gene não-essencial para replicação viral, sob o comando de um promotor forte, como por exemplo, o promotor do gene da poliedrina (polh). A deleção desse gene pela inserção do fragmento de DNA produz um vírus que é capaz de se replicar em células

de inseto, mas não expressa a poliedrina (matriz proteica formada para a proteção do (s) nucleocápsídeo(s) do baculovírus no ambiente). Já a inserção do fragmento de DNA fusionado ao gene da poliedrina produz um vírus que se replica e expressa a poliedrina de forma amorfa, quando comparado à expressão do vírus selvagem. As células infectadas pelo vírus irão expressar a proteína heteróloga de interesse e podem ser facilmente visualizadas no microscópio óptico, caracterizadas pela perda de morfologia e hipertrofia nuclear, além da presença de cristais amorfos no citoplasma da célula ou corpos de inclusão semelhantes a poliedros, no caso das proteínas fusionadas (SMITH et al, 1983; CASTRO et al, 1999; ROHRMANN, 2011).

A utilização de baculovírus como sistema de expressão de proteínas heterólogas possui algumas vantagens como a habilidade de realizar modificações pós-traducionais adequadas; a capacidade de inserir grandes insertos ou múltiplos genes, devido ao grande genoma viral; a biossegurança do manuseio das células e da utilização da proteína produzida, já que baculovírus não são capazes de infectar células humanas e um alto rendimento de proteína produzida devido à utilização de promotores fortes, como o promotor da poliedrina ou p10 que conferem uma alta expressão proteica (YU-CHEN, 2005).

Estas vantagens possibilitaram o uso de baculovírus na expressão de antígenos virais com finalidade vacinal e de diagnóstico, tanto humano, quanto veterinário. As vacinas contra Peste Suína (BAYOVAC CSF E2TM e PORCILIS PESTITM) foram produzidas pela expressão da glicoproteína de envelope E2 de CSFV (*classical swine fever virus*), já a vacina humana contra câncer cervical induzida por HPV (Cervarix®, GSK) foi produzida pela expressão das proteínas L1 de HPV-16 e HPV-18 (*human papillomavirus*) sob a forma de partículas tipo vírus (VLPs). Ambas estão sendo comercializadas a nível mundial (ZHENG et al, 2004 apud ARDISSON-ARAÚJO, 2012).

Outras pesquisas aplicadas na área biotecnológica utilizam o sistema de expressão baculoviral para a produção de kits de diagnóstico através da expressão de proteínas recombinantes com interesse médico. Pode-se citar como exemplo: os capsídeos virais das proteínas VPX e VP3 do birnavírus causador da doença da bursite infecciosa (IBD do inglês ‘infectious bursal disease’) e VP1 e VP2 do Parvovírus humano B19 que foram expressos para produção de kit de diagnóstico sorológico por ELISA (YOTO et al, 1995 apud ARDISSON-ARAÚJO, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um teste sorológico (ELISA) para detecção de anticorpos anti-NS1 de *Dengue virus* circulantes em pacientes em fase febril inicial. Tendo como ferramenta proteínas recombinantes produzidas utilizando o sistema baculovírus/célula de inseto para expressão heteróloga.

2.2 Objetivos Específicos

- Clonagem do gene NS1 e dos peptídeos imunogênicos AP-NS1 de *Dengue virus* sorotipos 1 a 4;
- Expressão em sistema baculovírus/célula de inseto das proteínas NS1 e dos peptídeos imunogênicos AP-NS1 de *Dengue virus* sorotipos 1 a 4 e construção dos baculovírus recombinantes;
- Purificação das proteínas produzidas;
- Padronização de ELISA indireto utilizando as proteínas produzidas;
- Testes de ELISA indireto para avaliação da sensibilidade, especificidade e reatividade cruzada do método proposto.
- Imunização de animais com as proteínas produzidas para a produção de anticorpos;
- Testes de imunogenicidade através de análise por *Western Blotting* utilizando o anticorpo produzido.

3 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico da Dengue no Brasil ainda não é realizado em condições ideais. Apesar da grande importância da doença e alta incidência, o teste disponibilizado na rede pública de saúde não possui sensibilidade suficiente nos primeiros sete dias de infecção, gerando falso-negativos o que pode levar a um tratamento inadequado e evolução do quadro. Portanto, o desenvolvimento de um sistema de diagnose de anticorpos anti-NS1 (anticorpos formados contra a proteína não-estrutural-1, que é expressada e secretada no sangue em altas concentrações na fase inicial da infecção, ou seja, nos primeiros sete dias) foi explorado. Os métodos comercializados embasados na detecção de NS1 circulante possuem baixa sensibilidade, levando também a resultados falso-negativos de Dengue. O presente trabalho teve como objetivo a clonagem, expressão da proteína NS1 utilizando o sistema baculovírus/células de inseto em duas estratégias distintas: proteína inteira fusionada a poliedrina do baculovírus e somente a região imunogênica, nomeada peptídeos imunogênicos de NS1 e realização de testes de ELISA indireto para captura de anti-NS1 a partir do antígeno imunogênico. A imunização de coelhos com a proteína resulta na produção de anticorpos específicos e reduzir em muito os custos de produção, além do impacto que esta técnica pode trazer na expressão de proteínas heterólogas recombinantes ou produção de anticorpos para outras proteínas de difícil purificação. A estratégia é inovadora, possibilita a detecção da doença nos primeiros sete dias após a infecção e viabilizar a produção de um sistema de diagnóstico sensível, específico. Se implementada irá aumentar a disponibilidade do teste para a população.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Plasmídeos e bactérias

Para construção e propagação dos diferentes plasmídeos usados neste trabalho foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* (*E.coli*) das linhagem DH5 α (Invitrogen).

Os plasmídeos pFB1-6xHis-AcPH (Figura 9) e pFB1-6xHis-TROMB utilizados para clonagens dos genes de interesse foram construídos e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro e aluno de doutorado Daniel Mendes Pereira Ardisson de Araújo do curso de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

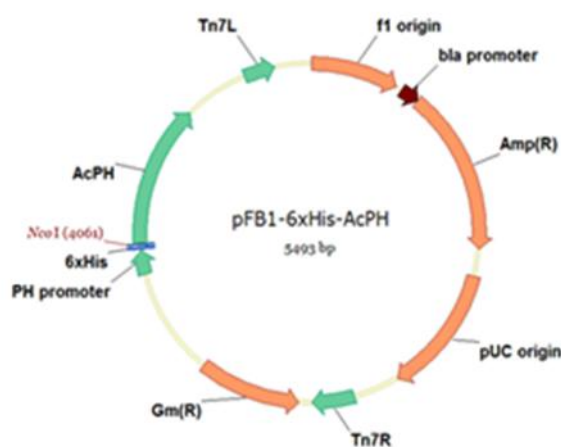


Figura 9. Mapa gênico do plasmídeo pFB1-6xHis-AcPH. Tn7L, Tn7R = braços homólogos para transposição, f1 origin = origem de replicação para cópias múltiplas, bla promoter = promotor de transposição de β -lactamase, Amp(R) = gene de resistência a ampicilina, pUC origin = origem de replicação oriundo de pUC19, Gm(R) = gene de resistência a Gentamicina, PH promoter = promotor da poliedrina, 6xHis = hexa-histidina, NcoI = sítio de clonagem NcoI, AcPH = gene de poliedrina de AcMNPV (ARDISSON-ARAÚJO, 2012).

4.2 Baculovírus e células de inseto

No presente trabalho foram utilizadas células de lepidópteros das linhagens BTI-Tn5B1-4 (*Trichoplusia ni*) derivada de *T.ni* (GRANADOS et al, 1994) (Figura 10), a lagarta do repolho (do inglês, 'cabbage looper'). As células foram mantidas a temperatura ambiente (27°C), em meio TC100 (Gibco, Sigma e HIMEDIA) suplementadas ou não com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Sigma e HIMEDIA) conforme o uso.

4.3 Obtenção de amostras

Células de *Aedes albopictus* de linhagem C6/36 foram previamente inoculadas com DENV-1, DENV-2 e DENV-4 no Laboratório de Virologia do LACEN-DF e cedidas para extração de RNA. O RNA de DENV-3 da cepa 74886 inoculadas em células Vero com título de cultura de 6,88 log₁₀ PFU/mL e título de RNA de 8,7x10⁴ RNA/mL foi extraído e cedido pelo Laboratório de Flavivirus (LABFLA) IOC-Fiocruz-RJ.

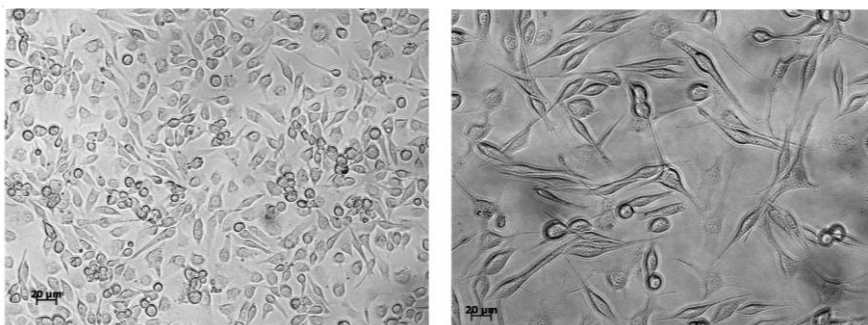


Figura 10. Cultura de células de inseto utilizadas neste trabalho. BTI-Tn5B-4 derivada da lagarta do repolho. Em menor (direita) e maior aumento (esquerda). Escala: Barra = 20µm.

4.4 Extração de RNA viral

O RNA total de células infectadas com DENV-1, DENV-2 e DENV-4 foi extraído e purificado utilizando o reagente Trizol LS (Invitrogen) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante com adaptações. Primeiramente, foi preparada uma solução contendo $\frac{1}{3}$ de RNA extraído e $\frac{2}{3}$ de Trizol LS, agitada manualmente e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Foi adicionado $\frac{1}{5}$ do volume da solução de clorofórmio livre de RNase agitado manualmente por 15 segundos e incubado por 7 minutos em temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos na centrífuga 'Centrifuge 5418' (Eppendorf). O RNA purificado foi transferido para um novo tubo e foi adicionado $\frac{1}{2}$ de isopropanol livre de RNase. A solução foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e foi adicionado etanol 75% livre de RNase, a solução foi agitada e centrifugada a 6.300 xg por 5 minutos. O etanol foi removido e o precipitado formado foi ressuspensionado em ddH₂O livre de RNase.

4.5 RT-PCR

O cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa (RT-PCR). Para a montagem da reação foram adicionados: RNA extraído (10 µL), oligonucleotídeo iniciador (primer) reverso (Conc. final = 50mM) específico para NS1 do DENV 1, 2, 3 ou 4 (Tabela 4) e dNTP (10mM) incubados a 75°C durante 5 minutos em seguida colocado no gelo e adicionado: 200U de enzima Superscript Reverse Transcriptase (Invitrogen), 5x de tampão First-Strand Buffer, 1U RNase out (Invitrogen), DTT (0,1mM), incubados a 45°C por 1 hora e desnaturado a 75°C por 15 min e adicionado 50U RNase H (Promega) à 37°C por 30 min.

4.6 PCR

A reação de polimerase em cadeia (PCR) do gene NS1 e do peptídeo AP derivado do gene NS1 continha: 10ng do cDNA, 5x de tampão de enzima com MgCl₂ (Cloreto de Magnésio), dNTP (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados) (Conc. final =10mM), 1 U de enzima LongAmp Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, NEB) ou Taq DNA Polimerase (Uniscience), respectivos primers reverso e *forward* (10mM) (Tabela 4 e 6) e ddH₂O. A amplificação foi feita no termociclador 'MJ Mini' (Bio-Rad) nos ciclos apontados nas tabelas 5 e 7.

Tabela 4. Primers para amplificação do gene NS1 de DENV 1-4 por PCR

	Forward	Reversa
DENV 1	5'- <u>ACA TGT</u> CA GA CTC GGG ATG CGT AAT CAA CTG GAA GGG CAG -3'	5'- <u>ACA TGT</u> CTG CAG AGA CCA TTG ACC TAA CTA GGT TCT CCT C -3'
DENV 2	5'- <u>ACA TGT</u> CA GAT AGT GGT TGC GTC GTG AGC TGG AAA AAC AAG G -3'	5'- <u>ACA TGT</u> T GC GGC TGT GAC CAA GGA GTT GAC CAA ATT CTC CTC -3'
DENV 3	5'- A TTG AAG <u>ACA TGT</u> CC ATG GGA TGT GTT AT -3'	5'- CTA GTG AT <u>ACA TGT</u> GCG CTG AGA CTA AAG -3'
DENV 4	5'- <u>GTC GAC</u> ATG GGT TGT GTG GTG TCA TGG AGT GGG -3'	5'- <u>GGG CCC</u> GGC CGT CAC CTG TGA TTT AAC CAT GTT -3'

Sublinhado ACA TGT representa o sítio de restrição PciI, GTC GAC representa o sítio de restrição Sall e GGG CCC representa o sítio de restrição ApaI.

Tabela 5. Programa utilizado para amplificação do gene NS1 de DENV 1-4.

	Etapa	Temperatura	Tempo
35 ciclos	Desnaturação inicial	94 °C	30 s
	Desnaturação Anelamento Extensão	94 °C	30 s
		55 °C	20 s
		65 °C	55 s
	Extensão final	65 °C	10 min
	Estoque	12 °C	∞

Tabela 6. Primers para amplificação dos peptídeos AP do gene NS1 de DENV 1-4 por PCR

	Forward	Reversa
AP-DENV 1	5' -GG AGG GCG <u>ACA TGT</u> CCA TTC GAT CA-3'	5' -CAT TTT <u>ACA TGT</u> GTG CTC CTA TGA TTT -3'
AP-DENV 2	5' - G CTA TCC AAA <u>ACA TGT</u> CCG AAA AGG G -3'	5' - CTG TGG AGA GCA <u>ACA TGT</u> CCT TTC CC-3'
AP-DENV 3	5' - GA ATG GAG <u>ACA TGT</u> CCA TTA GGT C AAC AAC C -3'	5' - GG AAT TTT <u>ACA TGT</u> GAG CTG TCA CTA TTT TTG C -3'
AP-DENV 4	5' - AG ATG GGG <u>ACA TGT</u> CCA TTA GAT CAA CCA CGA-3'	5' - GC TGT TTC <u>ACA TGT</u> GAG GGG TGA AGA TTT TTG C -3'

Sublinhado ACA TGT representa o sítio de restrição PciI

Tabela 7. Programa utilizado para amplificação dos peptídeos AP do gene NS1 de DENV1-4

	Etapa	Temperatura	Tempo
35 ciclos	Desnaturação inicial	94 °C	30 s
	Desnaturação Anelamento Extensão	94 °C	30 s
		57 °C	20 s
		72 °C	12 s
	Extensão final	72 °C	10 min
	Estoque	12 °C	∞

4.7 Clonagem no vetor pGEM[®]-T Easy e sequenciamento

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR, correspondentes ao gene NS1 ou aos nucleotídeos referentes aos peptídeos AP derivados do gene NS1 amplificados a partir do cDNA das respectivas amostras de DENV utilizadas para cada reação, foram adenilados [adição de desoxiadenilato (A) para posterior ligação a desoxitimidilato (T) sobressalente do vetor pGEM-T Easy] com a enzima Taq DNA Polymerase (Uniscience) no termociclador por 30 min a 70°C no meio do gene de um peptídeo marcador (peptídeo α da enzima β -galactosidase).

As reações foram aplicadas em gel de agarose 1% submetidos à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5X (solução aquosa de 5X contendo 45mM de Tris-base, 0,5M Ácido bórico e 0,5mM de EDTA), em cuba de eletroforese Mupid[®]-2plus Submarine-type Electrophoresis System (Advance) coradas em violeta cristal (solução aquosa concentração final de 400 μ g/ml). Os fragmentos obtidos foram cortados do gel com uma lâmina e purificados seguindo as instruções do fabricante utilizando o kit comercial 'GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit' (GE Healthcare), assim como todas as posteriores eluições realizadas no trabalho.

Os fragmentos purificados foram ligados no vetor pGEM-T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Por meio da reação do tampão de ligação 2X, 25 ng do vetor pGEM-T Easy, do inserto obtido (50 ng) pelo produto de PCR em proporções de (3:1) e da enzima T4 DNA ligase 2U.

A reação foi incubada a 4°C por 16 horas e em bactéria *E. coli* de cepa DH5 α (Invitrogen) eletrocompetente foram transformada por eletroporação, utilizando o eletroporador MicroPulser Electroporator (Bio-Rad) crescidas em meio Luria-Bertani, LB (10g de triptona, 5g de extrato de levedura e 5g de cloreto de sódio por litro, pH 7,2) líquido por 1 hora sob agitação a 37°C e plaqueadas em meio LB-ágar (meio Luria-Bertani com conc. final de ágar 1,5 %) sólido crescidas por 16 horas a 37°C. As colônias obtidas foram crescidas em LB líquido com antibiótico Ampicilina (conc. final 100 μ g/ml), IPTG (conc. final 40 μ g/mL) e X-Gal (conc. final 100 μ g/mL) por 16 horas a 37°C sob agitação. Foi realizada a extração de DNA plasmidial das colônias obtidas por minipreparação caseira. (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

Os plasmídeos recombinantes obtidos das colônias brancas foram digeridos com 3 U (0,3 μ L) de EcoRI (NEB) seguindo as instruções do fabricantes: reação do tampão 1 μ L de NEB EcoRI Buffer 10X, dH₂O e o DNA plasmidial (100 ng) (volume total de 10 μ L) incubada a 37°C por 16 horas. Para confirmação da clonagem a digestão foi separada por eletroforese em gel de agarose 1%, corada em brometo de etídeo (solução aquosa conc. final de 0,5 μ g/ml), analisada em luz UV (Alpha Innothech AlphaImager Mini) e fotografada. Os plasmídeos recombinantes que apresentaram o perfil de digestão esperados foram extraídos por minipreparação utilizando o kit 'Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System' (Promega) e em seguida foram submetidos a sequenciamento (Macrogen Inc., Coreia do Sul) com primers universais (SP6 e T7). (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

4.8 Clonagem no vetor de transferência e sequenciamento

4.8.1 Gene NS1

Os plasmídeos recombinantes confirmados por sequenciamento: pGEM-NS1-DENV1, pGEM-NS1-DENV2 e pGEM-NS1-DENV3 foram digeridos com a enzima PciI (NEB), enquanto o plasmídeo pGEM-NS1-DENV4 foi digerido com as enzimas ApaI e SalI (NEB). O vetor de transferência pFB1-6xHis-AcPH foi digerido com a enzima NcoI (NEB), ao mesmo tempo que o vetor pFB1-6xHis-TROMB-AcPH foi digeridos com as enzimas ApaI e SalI (NEB). Após a digestão incubada por 16 horas a 37°C, os vetores de transferência foram desfosforilados pela adição da enzima ‘Calf-intestinal Alkaline Phosphatase’ – CIP (NEB) por 1 hora a 37°C. Foi realizada uma eletroforese dos fragmentos obtidos para quantificação em gel de agarose 1% por visualização das bandas geradas através da luz UV. Os insertos NS1-DENV1, NS1-DENV2 e NS1-DENV3 foram ligados ao vetor pFB1-6xHis-AcPH e o inserto NS1-DENV4 foi ligado ao vetor pFB1-6xHis-TROMB-AcPH utilizando T4 DNA ligase (NEB) por 16 horas a 37°C. A bactéria *E. coli* de cepa DH5α (Invitrogen) foi transformadas com a ligação obtida por eletroporação da mesma maneira que as transformações previamente descritas. As colônias obtidas foram crescidas em LB líquido com antibiótico Ampicilina (conc. final 100µg/mL) por 16 horas a 37°C sob agitação. Foi realizada a extração de DNA plasmidial das colônias obtidas por minipreparação.

Para confirmação da clonagem, os plasmídeos recombinantes obtidos: pFB1-6xHis-NS1/DENV1-AcPH, pFB1-6xHis-NS1/DENV2-AcPH (Figura 11), pFB1-6xHis-NS1/DENV3-AcPH, foram digeridos com as enzimas de restrição: PstI (NEB), HindIII (NEB) e PciI (NEB), respectivamente, enquanto que o plasmídeo FB1-6xHis-TROMB/DENV4-AcPH foi digerido por digestão dupla com as enzimas ApaI (NEB) e SalI (NEB), seguindo as instruções do fabricante, incubada a 37°C por 16 horas, a digestão foi separada por eletroforese em gel de agarose 1%, analisada em luz UV e fotografada. Os plasmídeos recombinantes que apresentaram o perfil de digestão esperados foram extraídos por minipreparação utilizando o kit comercial (Promega) e em seguida foram submetidos a sequenciamento (Macrogen Inc., Coreia do Sul) com primers pFastBac Forward e/ou pFastBac Reverse. (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

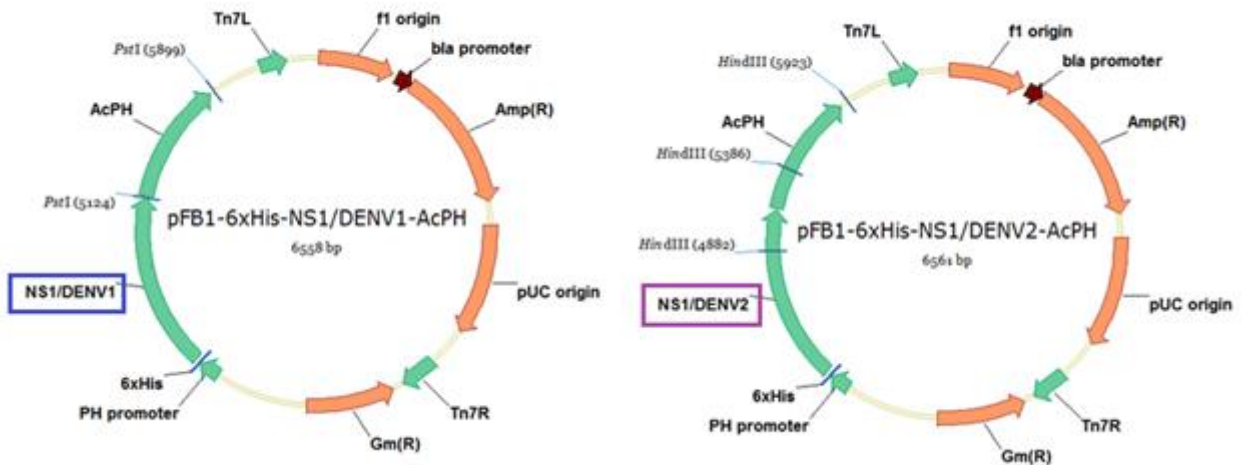


Figura 11. Mapa gênico dos plasmídeos construídos no presente trabalho: pFB1-6xHis-NS1/DENV1-AcPH e pFB1-6xHis-NS1/DENV2-AcPH. O gene NS1 de DENV foi inserido no sítio de clonagem NcoI. Tn7L, Tn7R = braços homólogos para transposição, f1 origin = origem de replicação para cópias múltiplas, bla promoter = promotor de transposição de β -lactamase, Amp(R) = gene de resistência a ampicilina, pUC origin = origem de replicação oriundo de pUC19, Gm(R) = gene de resistência a Gentamicina, PH promoter = promotor da poliedrina, 6xHis = hexa-histidina, NS1/DENV1= gene NS1 de DENV1, NS1/DENV2 = gene NS1 de DENV-2, PstI e HindII = sítios de clonagem, AcPH = gene de poliedrina de AcMNPV.

4.8.2 Peptídeo AP derivado do gene NS1

Os peptídeos AP foram clonados da mesma maneira que o gene NS1 inteiro previamente citado, todos os fragmentos obtidos de AP-NS1-DENV1, AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3 e AP-NS1-DENV4 foram digeridos com a enzima PciI (NEB) e clonados separadamente em pFB1-6xHis-AcPH previamente digerido com NcoI (NEB) (Figura 13).

No entanto, a confirmação dos clones obtidos foi realizada por PCR utilizando os primers AP-DENV Rev e For específicos para cada clone, 10 ng do DNA plasmidial, 5x de tampão de enzima com $MgCl_2$, 10mM de dNTP, 1U de enzima Taq DNA Polimerase (Uniscience) e ddH₂O e o mesmo programa previamente utilizado para obter os fragmentos alvo. A escolha da PCR se deu devido ao tamanho dos fragmentos clonados (300pb) serem dificilmente visualizados por digestão. Os plasmídeos recombinantes que amplificaram os fragmentos referentes aos peptídeos clonados foram extraídos por minipreparação utilizando o kit comercial (Promega) e em seguida foram submetidos a sequenciamento (Macrogen Inc., Coreia do Sul) com primers pFastBac For e pFastBac Rev. (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

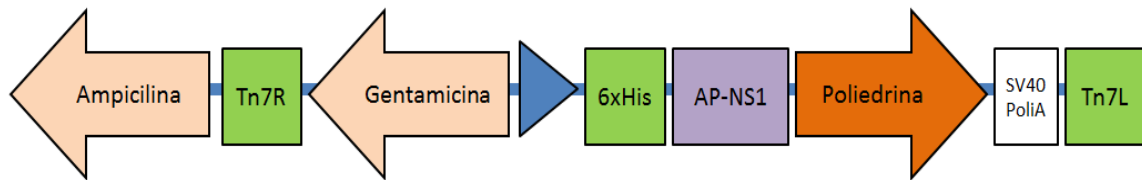


Figura 12. Mapa gênico representando os plasmídeos construídos no presente trabalho: pFB1-6xHis-AP-NS1/DENV-AcPH. Os nucleotídeos referentes ao peptídeos AP-NS1 de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 foram inseridos separadamente no sítio de clonagem Nco I do vetor de transferência pFB1-6xHis-AcPH. Ampicilina = gene de resistência a ampicilina, Tn7L, Tn7R = braços homólogos para transposição, Gentamicina = gene de resistência a Gentamicina, figura de um triângulo = promotor da poliedrina, 6xHis = hexa-histidina, AP-NS1 = nucleotídeos referentes aos peptídeos de DENV1-4 separadamente, Poliedrina = gene de poliedrina de AcMNPV, SV40 PoliA = sinal de poliadenilação.

4.9 Construção dos baculovírus recombinantes

Os baculovírus recombinantes construídos no presente trabalho foram produzidos utilizando o sistema de expressão baculoviral Bac-to-bac (Invitrogen). Os plasmídeos recombinantes confirmados por sequenciamento foram transformados em *E. coli* de cepa DH10Bac que possui dois plasmídeos necessários para que ocorra a transposição, o bacmídeo Bmon14272 (136kpb) e o plasmídeo ‘helper’ pMON14272 (13,2pb). O bacmídeo é um plasmídeo gigante que carrega o genoma do baculovírus AcMNPV e se propaga em *E. coli*, no entanto, seu fenótipo possui oclusão negativa ou seja, não forma poliedro. O plasmídeo ‘helper’ (do inglês, ‘ajudante’) possui uma enzima chamada transposase que realiza a transposição do cassete inserido no vetor de transferência pFB1 no bacmídeo Bmon14272 localizado na *E. coli* DH10Bac (Figura 13).

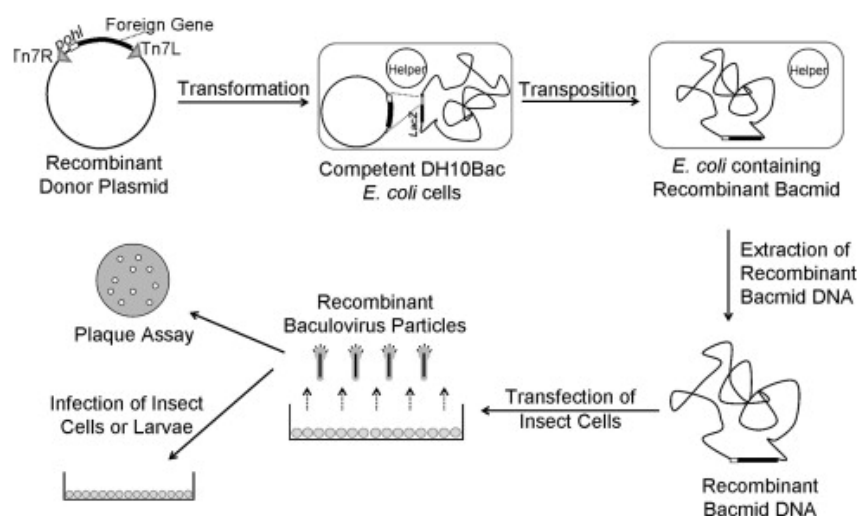


Figura 13. Sistema Bac-to-bac para construção dos baculovírus recombinantes (Invitrogen)

Para que ocorra a transposição é necessário transformar por choque térmico o plasmídeo doador chamado vetor de transferência, no caso do trabalho: pFB1-6xHis-AcPH e pFB1-6xHis-TROMB-AcPH em *E. coli* DH10Bac quimiocompetente. O DNA plasmidial consegue ser inserido na bactéria, já que sua membrana está suscetível devido a mudança brusca de temperatura do gelo para a incubação a 42°C por 2 minutos para o gelo novamente por 2 minutos. A bactéria é então crescida em meio SOC líquido (conc. finais de 2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10mM cloreto de sódio, 2,5mM cloreto de potássio, 10mM cloreto de magnésio, 10mM sulfato de magnésio e 20mM glicose) a 37°C por 4 horas e plaqueada em meio LB-ágar sólido com os antibióticos (conc. finais de canamicina 50µg/mL, gentamicina 7 µg/mL, tetraciclina 50µg/mL), X-Gal (conc. final 100 µg/mL) e IPTG (conc. final 40 µg/mL) e incubados a 37°C por 48 horas.

As colônias brancas obtidas foram crescidas em LB líquido com os mesmos antibióticos, nas mesmas concentrações por 16 horas a 37°C sob agitação. Foi realizada a extração de DNA do bacmídeo das colônias obtidas por minipreparação caseira.

Os bacmídeos recombinantes foram confirmados por PCR utilizando a combinação do primer específico Rev com M13 For ou específico For com M13 Rev (Tabela 8), 10 ng do DNA do bacmídeo usando enzima Taq DNA Polimerase (Uniscience) com a condição descrita anteriormente, utilizando o ciclo apontado na tabela 9.

Tabela 8. Primers para amplificação dos bacmídeos recombinantes (M13 For e M13 Rev)

	Forward	Reversa
M13	5' - GTTTTCCCAGTCACGAC -3'	5' - GAGCGGATAACAATTTACACAGG -3'

Tabela 9. Programa utilizado para amplificação dos bacmídeos recombinantes utilizando primers M13

	Etapa	Temperatura	Tempo
	Hot start	80°C	1 min
	Desnaturação inicial	94 °C	30 s
35 ciclos	<ul style="list-style-type: none"> Desnaturação Anelamento Extensão 	94 °C	30 s
		57 °C	20 s
		72 °C	2 min
	Extensão final	72 °C	10 min
	Estoque	12 °C	∞

4.10 Construção do vírus

4.10.1 Transfecção

Um micrograma de cada um dos bacmídeos confirmados foi aquecido a 100 °C por 5 min e transfectados via lipossomo com Cellfectin® II (Invitrogen) ou FUGENE®HD Transfection Reagent (Promega) conforme recomendações dos fabricantes. DNA do bacmídeo, Cellfectin® ou FUGENE®HD e meio TC100 foram incubados por 30 min em temperatura ambiente e adicionados na placa com 6 poços ‘Tissue culture flasks’ (TPP) contendo células de inseto de linhagem BTI-Tn5B-4 em meio sem soro fetal bovino (Cellfectin®) e com soro fetal bovino 10% (FUGENE®HD). Para as transfecções com cellfectin após 4 horas de incubação foi adicionado o meio com soro fetal bovino 10%, as transfecções foram mantidas a 27°C por 3 dias. Os sintomas de transfecção foram observados 120 h.p.i (5d.p.i). (horas pós-infecção).

4.10.2 Infecção

Após a confirmação da transfecção por meio de análise dos sintomas, os vírus obtidos e secretados no sobrenadante das células transfectadas foram utilizados na infecção de monocamadas confluentes de células BTI-Tn5B-4 e IPLB-Sf21-AE (cerca de 10⁶ células por placa), as infecções foram mantidas a 27 °C por 3 dias. Os sintomas de infecção foram observados 72 h.p.i. As células infectadas foram analisadas e fotografadas em microscopia de luz no microscópio de luz Axionvert 100 (Zeiss) utilizando o programa Axionvision 4.7.

4.10.3 Titulação viral

Os vírus construídos foram titulados por meio de diluições seriadas dos estoques virais coletados dos sobrenadantes das células infectadas. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços ‘Tissue culture flasks’ (TPP) contendo monocamada de células BTI-Tn5B-4. Foram realizadas 8 diluições virais seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁸). As titulações foram mantidas a 27 °C por 5 dias. 120 h.p.i cada poço foi analisado e marcado com o diagnóstico de poço infectado ou não. Foram somados os poços infectados em cada fileira referente a cada diluição e o título viral foi obtido por análise estatística de TCID₅₀ (dose infectante 50 %), neste caso calcula-se a diluição que provoca infecção em pelo menos 50 % da cultura de célula inoculada, ou seja, identifica-se a diluição capaz de infectar ao menos metade das culturas inoculadas.

4.11 Análise de expressão das proteínas obtidas

Para análise da expressão das proteínas recombinantes produzidas, monocamadas confluentes de células de inseto BTI-Tn5B-4 ou IPLB-Sf21-AE foram infectadas com os baculovírus recombinantes separadamente com MOI (multiplicidade de infecção de vírus por célula) de 10 em garrafas grandes 'Tissue culture flasks' 75 cm² (TPP). 72 h.p.i as células infectadas foram re-suspendidas no próprio meio TC100 de cultivo e centrifugadas a 5.000 xg por 10 min na centrifuga 'J2-MI Centrifuge' (Beckman). O sobrenadante formado foi estocado a 4 °C, enquanto que o precipitado foi re-suspendido em PBS 1X com inibidor de protease (10 µg/mL) e novamente centrifugado com as mesmas condições, esta etapa de lavagem com PBS 1X foi repetida duas vezes, totalizando três lavagens. O precipitado final foi re-suspendido em um menor volume de PBS 1X com inibidor de protease (10 µg/mL). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min.

Os extratos celulares foram aplicados em gel SDS-PAGE 12 % (do inglês 'Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis'), assim como o marcador de massa molecular 'PageRuler™ Prestained Protein Ladder' (Fermentas) e corridos a 120V usando o aparelho Mini-Protean Cell (BioRad) seguindo as instruções do fabricante. Após a corrida, um dos géis foi incubado em Solução Corante [0,1% (w/v) de azul de Coomassie, 20% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético] por 1 hora em agitação, em seguida foi incubado em Solução Descorante [30 % (v/v) metanol e 10 % (v/v) de ácido acético] por 2 horas em agitação, o gel pode então ser analisado.

Com o outro gel foi realizado o *Western Blotting*. O gel foi incubado em tampão de transferência (conc. finais 192 mM Glicina, 25 mM Tris-base, 20 % Metanol, pH 9,2) por 15 min e transferido para a membrana de nitrocelulose Hybond™-C Extra (Amersham Biosciences) utilizando o 'Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic' (BioRad) por 15 min. A membrana foi então bloqueada com PBS/leite (leite em pó desnatado 5 % em PBS 1X) por 16 horas. Em seguida, foi colocada em solução contendo o anticorpo primário anti-hexa-histidina (6xHis) monoclonal de camundongo (GE Healthcare) diluído 1:10.000 em PBS/leite (leite em pó desnatado 0,5 % em PBS 1X) por 1 hora sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes com tampão PBS/Tween 0,1 % e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído 1:10.000 em solução PBS/leite (leite em pó desnatado 0,5 % em PBS 1X) por 1 hora sob agitação. A membrana foi novamente lavada três vezes com tampão PBS/Tween 0,1 %. Por fim, a membrana foi incubada em solução reveladora contendo NBT 'Nitro Blue Tetrazolium' (Sigma-Aldrich) e BCIP '5-Bromo 4-Cloro 3-Indolyl Phosphate' (Sigma- Aldric) diluída em tampão fosfatase alcalina [conc. finais Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 9,5]. Após o aparecimento das bandas referentes às proteínas de interesse, a reação foi interrompida com sucessivas lavagens em dH₂O.

4.12 Purificação de proteína

Para purificação das proteínas obtidas, monocamadas confluentes de células de inseto BTI-Tn5B-4 foram infectada com os baculovírus recombinantes separadamente com MOI =10 em 10 garrafas grandes ‘Tissue culture flasks’ 75 cm² (TPP). 5 d.p.i (dias pós infecção) as células infectadas foram re-suspendidas no próprio meio TC100 de cultivo e centrifugadas a 5.000 xg por 10 min. O precipitado foi re-suspendido em PBS 1X com inibidor de protease (10 µg/mL, Sigma-Aldrich) e novamente centrifugado com as mesmas condições, esta etapa de lavagem com PBS 1X foi repetida duas vezes, totalizando três lavagens.

A amostra foi sonicada quatro vezes com duração de 15 segundos cada com três intervalos de 15 segundos no Sonicador Ultrassônico (Bandelin), em seguida, foi centrifugada a 5.000 xg por 10 min. O precipitado formado foi re-suspendido em Triton X-100 5 % e novamente centrifugado a 5.000 x g por 10 min, esta etapa foi repetida duas vezes. O precipitado foi re-suspendido em 0,5 M NaCl (Cloreto de Sódio) e centrifugado nas mesmas condições anteriores.

O último precipitado formado foi re-suspendido em PBS 1X com inibidor de protease e aplicado no gradiente de sacarose 40-80 %, preparado previamente (solução de sacarose dissolvida em PBS 1X, aplicada em tubos de policarbonato, da maior concentração para a menor e incubada a 4 °C por 16 horas). O gradiente acrescido da amostra foi ultracentrifugado a 124.503 xg por 75 min. no rotor SW28 na ultracentrifuga ‘Optima L-90K Ultracentrifuge’ (Beckman Coulter).

As frações formadas após a ultracentrifugação foram coletadas, para cada banda formada foram adicionados PBS 1X e inibidor de protease (10 µg/ml, Sigma-Aldrich) e as amostras foram novamente ultracentrifugadas a 120.016 xg por 1 hora no rotor SW 40. O precipitado formado foi re-suspendido em um menor volume de PBS 1X com inibidor de protease (10 µg/mL, Sigma). As amostras foram analisadas em géis SDS-PAGE 12 %, o primeiro corado com azul de Coomassie e o segundo transferido para membrana de nitrocelulose para a realização do *Western Blotting* e quantificadas, utilizado o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Uniscience) e o kit Quanti-iT™ Protein Assay (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante.

4.13 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos cristais obtidos por purificação dos peptídeos

Os cristais proteicos previamente purificados e quantificados foram ressuspendidos em ddH₂O e acrescentado 3 vezes o volume de acetona 100 %, centrifugados a 14.000 rpm por 5 min e ressuspendido novamente em acetona com o mesmo volume inicial. As amostras foram carregadas no suporte porta-amostra do microscópio (‘stub’) e incubadas a 37 °C por 16 horas, em seguida, uma fina camada de ouro foi depositada nas amostras pelo processo de ‘sputtering’,

para tornar o material bom condutor térmico e elétrico. A visualização foi realizada no microscópio eletrônico de varredura 'JEOL JSM-70014 Field Emission Scanning Electron Microscope'.

4.14 Alinhamento das sequências de aminoácidos dos peptídeos imunogênicos

As sequências de aminoácidos dos quatro peptídeos imunogênicos foram alinhadas e comparadas quanto à polaridade à hidrofobicidade e à estrutura secundária utilizando o programa de bioinformática Genious® 6.1.4, além disso, a estrutura terciária dos peptídeos fusionados à poliedrina e a cauda de histidina foram modelados utilizando o SWISS-MODEL Expasy (Disponível em: <<http://swissmodel.expasy.org>> Acesso em: jul de 2013).

4.15 Imunização dos ratos

Para as imunizações, foram utilizados quatro ratos (*Rattus norvegicus*) com cinco semanas de vida e soluções contendo 200 µl (200 µg) das proteínas obtidas previamente, a um intervalo de 15 dias entre cada injeção e entre a última injeção e a extração do sangue dos animais, totalizando 45 dias.

Na primeira imunização (dia 0), 200µg das proteínas obtidas foram emulsificados com adjuvante completo de Freund's (Sigma-Aldrich), na proporção 1:1. A solução obtida foi injetada na região dorsal, subcutânea, dos ratos. Na segunda imunização (dia 15), 200 µg das proteínas foram emulsificadas com adjuvante incompleto de Freund's (Sigma-Aldrich), na proporção 1:1 e injetadas nos ratos. Na terceira e última imunização (dia 30), somente as proteínas de interesse (200 µg) foram injetadas nos ratos. No dia 45, os ratos foram sedados com Xilazina (10 mg/kg) e Quetamina (75 mg/kg) na proporção 1:1. O sangue dos animais foi extraído por punção cardíaca e incubado por 3 h a 37 °C. Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. O sangue coagulado foi centrifugado por 20 min a 2000 xg, o plasma obtido contendo os anticorpos de interesse foi coletado e estocado a -20 °C.

4.16 Purificação de IgG

Para a purificação de IgG, 1 ml do plasma contendo os anticorpos de interesse foi descongelado e foram adicionados 9 ml de ddH₂O. Em seguida, 5 ml de (NH₄)₂SO₄ (sulfato de amônio) foram cuidadosamente adicionados. A solução obtida foi incubada a 4 °C por 2 horas e centrifugada por 20 min a 5000 xg. O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. 5 ml de (NH₄)₂SO₄ foram novamente adicionados, a nova solução foi incubada a 4 °C por 2 horas e centrifugada por 20 min a 5000 xg. O precipitado foi coletado e re-suspendido em 1 mL de PBS 0,5x pH=7,2.

A solução foi dialisada em 1 L de PBS 0,5x pH=7,2 sob agitação em câmara fria (4 °C). Foram realizadas três trocas de tampão a primeira foi mantida por 16 horas, a segunda e a terceira por 2 horas, no entanto, na última o PBS utilizado possuía pH=6,5.

Para a montagem da coluna foi utilizado DEAE-Sephacel (GE Healthcare, Life Sciences) em PBS 0,5x pH=6,5. A solução dialisada foi aplicada na coluna e eluída com PBS 0,5x pH=6,5. Cinco frações de 1 ml cada foram coletadas e a absorbância foi analisada em Espectrofotômetro (SmartSpec Plus, Bio-rad), com parâmetro esperado de $E_{0,1\%} = 1,4$ em UV com comprimento de onda de 280nm. A fração escolhida foi mantida em 4 °C com 50 % de glicerol (v/v) e o estoque foi mantido a -20 °C.

4.17 *Western-blotting* para análise de IgG

Para a confirmação da correta produção do IgG obtido através da imunização dos ratos e análise da eficiência de marcação do anticorpo produzido. *Western-blotting* (imunomarcação) foi realizada utilizando as proteínas recombinantes produzidas em extratos celulares aplicados em quatro géis SDS-PAGE 12%, o primeiro gel foi corado com Solução Corante (azul de Coomassie), os outros géis foi transferido para membrana de nitrocelulose, o segundo foi incubado com o anticorpo primário anti-hexa-histidina (6xHis) monoclonal de camundongo diluído 1:10.000, o terceiro gel foi incubado com anticorpo obtido (IgG purificado dos ratos imunizados) diluídos 1:1.000 e por fim o quarto gel foi incubado com anticorpo obtido (soro bruto contendo IgG do ratos imunizados) diluídos 1:1.000, os três géis foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído 1:10.000, revelados com NBT e BCIP diluídos em fosfatase alcalina para posterior análise das bandas encontradas.

4.18 Padronização ELISA indireto

O ELISA indireto foi realizado no Laboratório de Flavivírus (LABFLA), laboratório de referência regional, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro.

O protocolo padrão utilizado no LABFLA para a realização de ELISA indireto inclui a sensibilização da placa de 96 poços (*Costar*, Corning Inc.) com a proteína de interesse e incubação durante 16 horas a 4 °C, três lavagens consecutivas em lavadora automática de microplacas (CE- Asys Atlantis, Biochrom) utilizando tampão PBS 1X pH=7,4, bloqueio com soro de cabra 3 % (Sigma-Aldrich), Tween 20 0,05 % e PBS 1X pH=7,4 incubado a 37 °C por 1 hora, novamente três lavagens, adição de soro humano de interesse em PBS 1X pH=7,4 e 3 % de leite em pó desnatado incubado a 37 °C por 1 hora, três lavagens, adição de anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) em PBS 1X pH=7,4 e 3 % de leite em pó desnatado incubado a 37 °C, três lavagens e adição do substrato ABTS[®] e Peroxidase

(Peroxidase Substrate System), na proporção 1:1, incubados a 37 °C e leitura da densidade óptica (OD) com comprimento de onda de 450 nm em leitor de microplaca (Multiskan EX – Thermo Scientific).

Os parâmetros alterados para a padronização do teste realizado foram: quantidade de proteína por poço para a sensibilização da placa (1 µg, 2 µg e 5 µg), tempo de bloqueio (30 min e 1 hora), diluição do soro humano (1:10 e 1:40), diluição do anticorpo anti-IgG humano conjugado (1:500 e 1:1000) e tempo de sensibilização com substrato e peroxidase (30 min e 1 hora).

4.19 ELISA indireto

4.20.1 Soros utilizados

Todos os soros de pacientes utilizados no presente trabalho foram retirados do banco de dados do LABFLA de projetos em andamento no laboratório, previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos (CEP:274/05).

Os soros positivos foram previamente confirmados como positivos para DENV nos sete primeiros dias de infecção por PCR ou Isolamento viral ou ambos durante a rotina do laboratório. No total, 309 amostras de DENV foram utilizadas durante os testes, dentre elas 65 positivas para DENV-1, 79 positivas para DENV-2, 79 positivas para DENV-3 e 86 positivas para DENV-4. Todas as amostras analisadas foram coletadas do primeiro ao sétimo dia após o aparecimento dos sintomas, ou seja, as amostras de soro positivo utilizadas foram de paciente em fase aguda de infecção. Sessenta soros negativos foram testados, estes incluem soro de pacientes com sintomas de dengue, no entanto, com diagnóstico negativo por PCR ou Isolamento viral. Os soros humanos normais (SHN) contemplam soros de pacientes saudáveis, sem sintomas de dengue ou outras patologias com sintomas semelhantes. Os soros de pacientes confirmados para Febre Amarela, Rubéola ou Sarampo (12 soros de cada) foram utilizados para avaliar a reatividade cruzada da proteína de interesse contra anticorpos de doenças com sintomas semelhantes.

4.20.2 Determinação do *cut-off*

O *cut-off*, índice que determina o limite entre amostras positivas e negativas, foi calculado para cada placa realizada, considerando que cada placa contempla uma reação enzimática diferente, no entanto, um *cut-off* geral para todos os testes também foi calculado.

O cálculo do *cut-off* foi padronizado com a média das amostras negativas (soro negativo, SHN e PBS 1x pH=7,4) mais três vezes o desvio-padrão encontrado.

4.20.3 Cálculo para determinação da sensibilidade, especificidade e eficiência do ensaio de ELISA

Os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram realizados da seguinte forma:

Sensibilidade: $(VP / VP+FN) \times 100\%$;

Especificidade: $(VN / VN+FP) \times 100\%$;

VPP: $(VP / VP+FP) \times 100\%$;

VPN: $(VN / VN+FN) \times 100\%$.

Eficiência: $(VN+VP)/(VN+NN+VP+FP)$

Onde:

- VP = número de verdadeiros positivos
- FP = número de falsos positivo
- VN = número de falso negativo
- FN = número de verdadeiros negativos

Em que:

Sensibilidade é a capacidade de detectar a doença quando de fato está presente.

Especificidade é a probabilidade do teste ser negativo na ausência de doença, ou seja, quantos resultados negativos serão obtidos nos indivíduos saudáveis.

Valor preditivo é a probabilidade após o teste ser realizado de um resultado positivo ter realmente detectado a doença, e de um paciente com teste negativo não ter a doença.

Eficiência é a probabilidade de um teste classificar corretamente indivíduos infectados e não-infectados de uma população com uma dada prevalência.

Tabela 10. Tabela de contingência para avaliar a validade interna do teste

Resultado do teste	Amostras confirmadas		
	Soro positivo	Soro negativo	
Positivo	VP	FP	Total de testes positivos
Negativo	FN	VN	Total de testes negativos
	Total de doentes	Total de sadios	Total de amostras

4.20.4 Ensaios realizados

Nos testes de ELISA indireto quatro ensaios foram realizados: testes de sensibilidade dos peptídeos individualmente, teste da mistura dos peptídeos e teste dos soros negativos com diferentes soros de pacientes, contemplando os quatro sorotipos de DENV, além do teste de reatividade cruzada dos peptídeos isolados e misturados em contato com soro de paciente diagnosticado com Febre Amarela, Rubéola ou Sarampo.

Para realização dos testes, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 5 µg dos peptídeos (cristais protéicos) de DENV-2, DENV-3, DENV-4 separadamente e com a mistura dos três peptídeos. Em seguida foram adicionadas amostras de soro de paciente de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, além dos controles: controle negativo (NEG), soro humano normal (SHN) e PBS 1X pH=7,4, usados para o cálculo do *cut-off* de cada placa.

Nas placas sensibilizadas com cada peptídeo separadamente, quarenta e dois soros de DENV foram testados, para cada placa vinte e quatro soros do sorotipo utilizado durante a sensibilização e seis dos outros três sorotipos, incluindo seis de cada controle: controle negativo (NEG), soro humano normal (SHN) e PBS 1X pH=7,4, totalizando sessenta poços. Já nas placas sensibilizadas com a mistura dos três peptídeos: DENV-2, DENV-3, DENV-4, representando o protótipo do kit desenvolvido, foram testadas 309 amostras, dentre elas 65 para DENV-1, 79 para DENV-2, 79 para DENV-3 e 79 para DENV-4.

Sessenta soros negativos contemplando soro de pacientes com sintomas de dengue, no entanto, com diagnóstico negativo por PCR ou Isolamento viral foram testados em quatro placas sensibilizadas com os três peptídeos separadamente e com a mistura dos três peptídeos na mesma placa.

Foram realizados, também, testes de reatividade cruzada, no qual as placas foram sensibilizadas com 5 µg dos peptídeos de DENV-2, DENV-3, DENV-4 separadamente e com a mistura dos três peptídeos e incubadas com soro de pacientes previamente diagnosticados com Febre Amarela, Rubéola ou Sarampo, para analisar a especificidade do teste proposto.

5 RESULTADOS

5.1 Amplificação do gene NS1 de DENV1-4

O RNA total de células infectadas com DENV-1, DENV-2 e DENV-4 foi extraído. O RNA de DENV-3 foi gentilmente cedido pelo LABFLA/IOC/FIOCRUZ. cDNA de DENVs foram sintetizado por meio de uma reação de RT-PCR.

Após reação de PCR foram obtidos quatro fragmentos de 1kb referentes ao gene NS1 e aos sítios de enzimas de restrição adicionados, nomeados NS1-DENV1, NS1-DENV2, NS1-DENV3, NS1-DENV4 (Figura 14-A e 14-B).

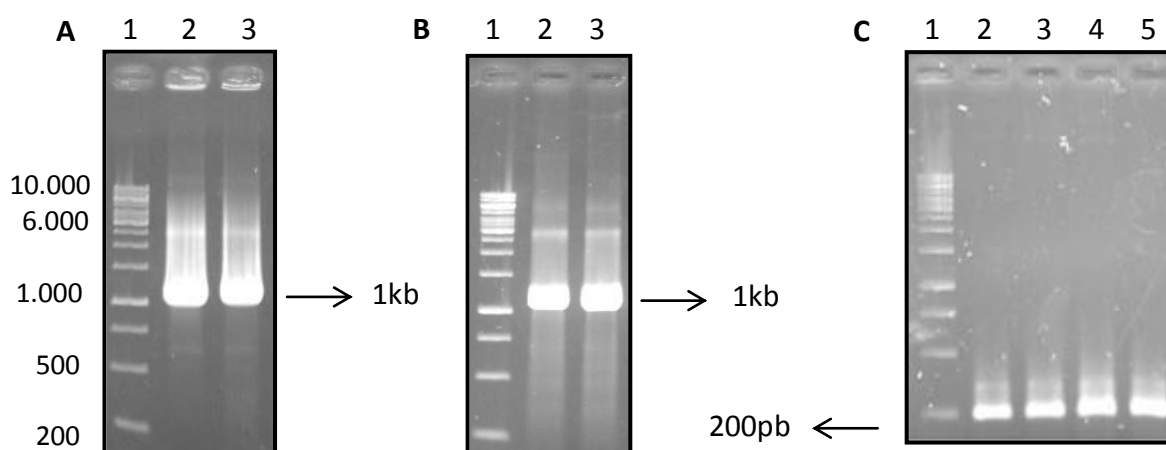


Figura 14. Eletroforese de gel de agarose 1%. (A) e (B) Análise da reação de amplificação do gene NS1 de DENV1-4. (C) Análise da reação de amplificação de fragmentos referentes aos peptídeos do gene NS1. (A) 1 - GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – PCR NS1-DENV1; 3 – PCR NS1-DENV2. (B) 1 - GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 - PCR NS1-DENV3; 3 - PCR NS1-DENV4. (C) 1 - GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – PCR AP-NS1-DENV1; 3 – PCR AP-NS1-DENV2; 4 - PCR AP-NS1-DENV3; 5 - PCR AP-NS1-DENV4.

5.2 Amplificação dos peptídeos do gene NS1 de DENV1-4

Os peptídeos construídos correspondem ao domínio antigênico da proteína NS1 (aa 57 a 126) conforme descrição por Mason et al, 1990.

A partir dos fragmentos de NS1 obtidos por PCR, uma nova PCR foi realizada para a amplificação dos peptídeos de interesse. Após reação de PCR, foram obtidos quatro fragmentos com cerca de 200 pb correspondentes aos peptídeos do gene NS1 e aos sítios de enzimas de restrição adicionados, nomeados AP-NS1-DENV1, AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. (Figura 14-C). As sequências respectivas aos nucleotídeos do gene NS1 de DENV1-4 e aos aminoácidos da proteína de NS1 de DENV1-4.

5.3 Clonagem no vetor pGEM[®]-T Easy

Oito fragmentos obtidos referentes à amplificação do gene NS1 de DENV1-4 e AP-DENV1-4 foram separadamente purificados e clonados no vetor pGem[®]-T Easy (3.015pb) gerando oito recombinantes: pGEM-NS1-DENV1 (4087 pb); pGEM-NS1-DENV2 (4091 pb); pGEM-NS1-DENV3 (4100 pb); pGEM-NS1-DENV4 (4082 pb); pGEM-AP-NS1-DENV1 (3265 pb); pGEM-AP-NS1-DENV2 (3264 pb); pGEM-AP-NS1-DENV3 (3258 pb); pGEM-AP-NS1-DENV4 (3258 pb).

Estes plasmídeos recombinantes foram confirmados por análise de perfil de restrição com a enzima de restrição EcoRI (NEB), gerando fragmentos de 3kb referente ao vetor pGEM-T Easy e aproximadamente 1kb referentes aos insertos de NS1 (Figura 15-A) ou 200 pb referentes aos insertos AP-NS1 (Figura 15-B) e por sequenciamento (Macrogen Inc., Coreia do Sul) utilizando os primers universais SP6 e T7.

Todos os resultados confirmaram correta construção dos plasmídeos recombinantes.

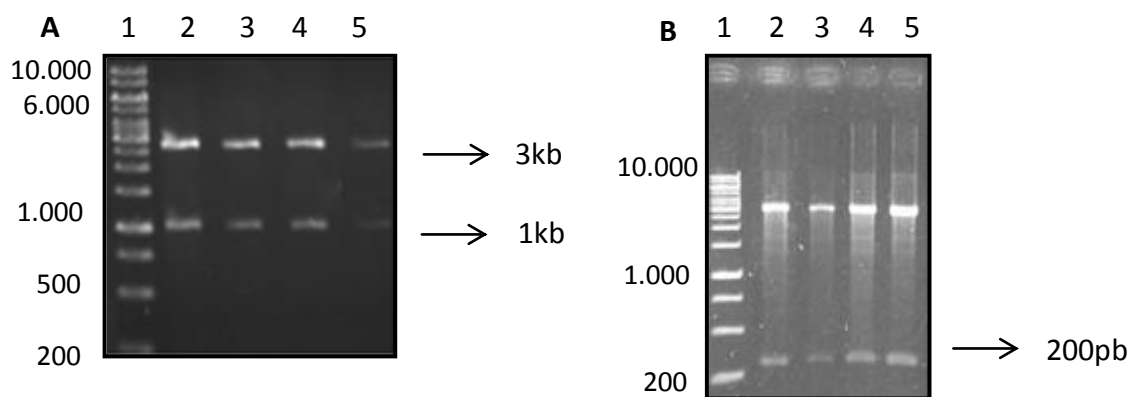


Figura 15. Eletroforese de gel de agarose 1%. (A) Análise de perfil de restrição de pGEM-NS1-DENV1-4 com enzima de restrição EcoRI (NEB). (B) Análise de perfil de restrição de pGEM-NS1-DENV1-4 com enzima de restrição EcoRI (NEB). (A) 1 – GeneRuleTM 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – pGEM-NS1-DENV1/EcoRI; 3 – pGEM-NS1-DENV2/EcoRI; 4 – pGEM-NS1-DENV3/EcoRI; 5 – pGEM-NS1-DENV4/EcoRI. (B) Gel de agarose 1%: 1 – GeneRuleTM 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2 – pGEM-AP-NS1-DENV1/EcoRI; 3 – pGEM-AP-NS1-DENV2/EcoRI; 4 – pGEM-AP-NS1-DENV3/EcoRI; 5 – pGEM-AP-NS1-DENV4/EcoRI.

5.4 Clonagem nos vetores de transferência

Após a confirmação da correta construção por sequenciamento todos os plasmídeos recombinantes foram digeridos com a enzima Pci-I (NEB), com exceção do plasmídeo pGEM-NS1-DENV4 que foi digerido com as enzimas Apa-I e Sal-I (NEB), já que havia um sítio interno de Pci-I no gene NS1 de DENV4. O vetores de transferência pFB1-6xHis-AcPH foi digerido com a enzima Nco-I (NEB), ao mesmo tempo que o vetor pFB1-6xHis-TROMB foi digeridos com as enzimas Apa-I e Sal-I (NEB).

O vetor de transferência pFB1-6xHis-AcPH foi ligado separadamente aos sete fragmentos obtidos NS1-DENV1, NS1-DENV2, NS1-DENV3, AP-NS1-DENV1, AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3 e AP-NS1-DENV4, enquanto que o vetor pFB1-6xHis-TROMB foi ligado ao NS1-DENV4. Bactéria *E. coli* de cepa DH5 α (Invitrogen) foram transformadas com os plasmídeos obtidos, as colônias formadas foram crescidas e o DNA plasmidial extraído por minipreparação.

Para confirmação da clonagem, os plasmídeos recombinantes obtidos: pFB1-6xHis-NS1/DENV1-AcPH (6546 pb), pFB1-6xHis-NS1/DENV2-AcPH (6549 pb), pFB1-6xHis-NS1/DENV3-AcPH (6543 pb), pFB1-6xHis-TROMB/DENV4-AcPH (6591 pb) foram digeridos com as enzimas PstI (NEB), HindIII (NEB), PciI (NEB) e ApaI, SalI (NEB) respectivamente. Os plasmídeos recombinantes que apresentaram o perfil de digestão esperados, (Figura 16) foram extraídos por minipreparação e em seguida foram submetidos a sequenciamento (Macrogen Inc., Coreia do Sul) com primers pFastBac For e/ou pFastBac Rev. Os plasmídeos recombinantes: pFB1-6xHis-AP-NS1/DENV1-AcPH, pFB1-6xHis-AP-NS1/DENV2-AcPH, pFB1-6xHis-AP-NS1/DENV3-AcPH e pFB1-6xHis-AP-NS1/DENV4-AcPH foram confirmados por PCR. Gerando fragmentos esperados com cerca de 200pb e posteriormente foram submetidos a sequenciamento com primers pFastBac For e/ou pFastBac Rev (Macrogen Inc., Coreia do Sul). Todos os resultados confirmaram correta construção dos plasmídeos recombinantes.

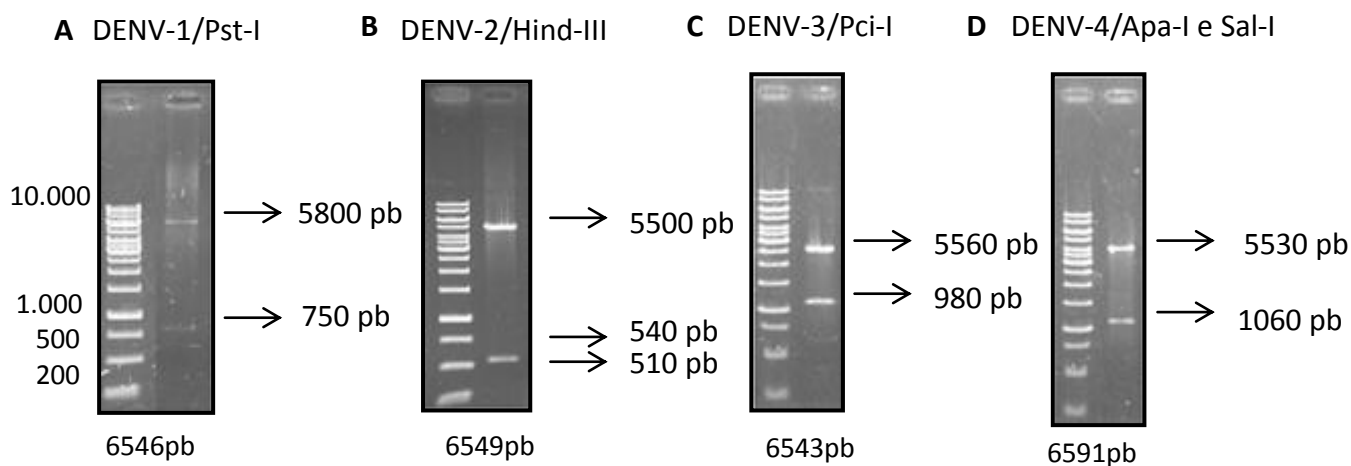


Figura 16. Eletroforese de gel de agarose 1% contendo análise de perfil de restrição dos vetores de transferência obtidos pela ligação do gene NS1 de DENV1-4. Marcador de peso molecular: GeneRuleTM 1kb DNA Ladder (Fermentas). (A) pFB1-6xHis-NS1/DENV1-AcPH (6546 pb) digerido com PstI (NEB) gerando fragmentos de 5800 pb e 750 pb. (B) pFB1-6xHis-NS1/DENV2-AcPH (6549 pb) digerido com HindIII (NEB) gerando fragmentos de 5500 pb, 540 pb e 510 pb (banda única). (C) pFB1-6xHis-NS1/DENV3-AcPH (6543 pb) digerido com PciI (NEB) gerando fragmentos de 5560 pb e 980 pb. (D) pFB1-6xHis-TROMB/DENV4-AcPH (6591 pb) digerido por digestão dupla com ApaI (NEB) e SalI (NEB) gerando fragmentos de 5530 pb e 1060 pb.

5.5 Construção do baculovírus recombinante

Bactérias *E. coli* da linhagem DH10Bac (Invitrogen) foram transformadas com os plasmídeos recombinantes construídos: pFB1-6xHis-NS1/DENV1-AcPH; pFB1-6xHis-NS1/DENV2-AcPH; pFB1-6xHis-AP-NS1/DENV1-AcPH; pFB1-6xHis-AP-NS1/DENV2-AcPH; pFB1-6xHis-AP-NS1/DENV3-AcPH; pFB1-6xHis-AP-NS1/DENV4-AcPH e geraram bacmídeos recombinantes.

Os bacmídeos recombinantes selecionados foram confirmados por PCR usando combinações dos primers M13 Rev com os primers específicos For e M13 For com os primers específicos Rev. Gerando fragmentos esperados com aproximadamente 2300 pb e 1800 pb respectivamente para os bacmídeos: bac-NS1/DENV1, BAC-NS1/DENV2 e 1500 pb e 1300 pb para os bacmídeos: BAC-AP-NS1/DENV1, BAC-AP-NS1/DENV2, BAC-AP-NS1/DENV3, BAC-AP-NS1/DENV4. Certificando a correta transposição dos *cassetes* advindos dos plasmídeos doadores recombinantes e a presença de DNA viral (Figura 17).

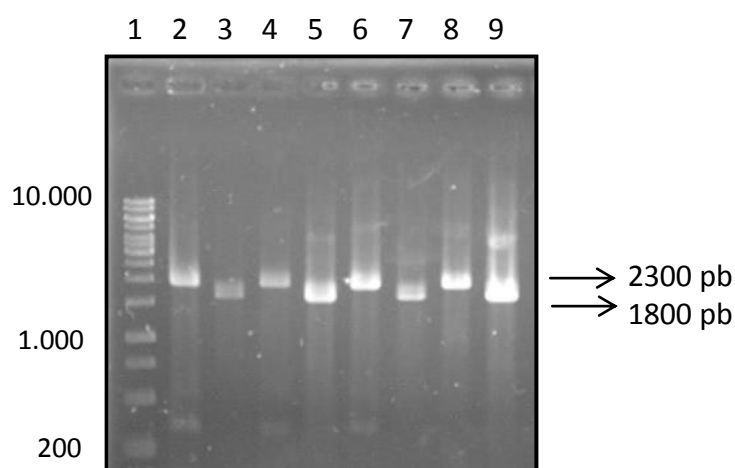


Figura 17. Eletroforese de gel de agarose 1% contendo PCR dos bacmídeos: BAC-AP-NS1/DENV1 (2, 3, 4, 5) e BAC-NS1/DENV2 (6, 7, 8, 9), amplificados com combinações dos primers M13 Rev com os primers específicos For (2, 4, 6, 8) e M13 For com os primers específicos Rev (3, 5, 7, 9). Marcador de peso molecular: (1) GeneRule™ 1kb DNA Ladder (Fermentas).

5.6 Construção do vírus

5.6.1 Transfecção

Depois de confirmados por PCR, os bacmídeos recombinantes foram utilizados em ensaio de transfecção via lipossomo em células de inseto da linhagem BTI-Tn5B1, para dessa forma gerar os baculovírus recombinantes.

As células foram observadas por microscopia óptica e características infectivas foram observadas 96 h.p.i (4 d.p.i). Em um primeiro momento, observou-se que as células pararam de se dividir, em seguida perderam sua morfologia característica; formato de gota, para adquirirem morfologia arredondada, o núcleo foi hipertrofiado e cristais proteicos, como poliedros amorfos, foram formados dentro do citoplasma e em alguns casos, dentro do núcleo, corroborando a eficiência da transfecção viral (Figuras 19 e 20). As características das células infectadas foram os primeiros indícios da construção dos baculovírus recombinantes: vAc-NS1/DENV1; vAc-NS1/DENV2; vAc-AP-NS1/DENV1; vAc-AP-NS1/DENV2; vAc-AP-NS1/DENV3; vAc-AP-NS1/DENV4.

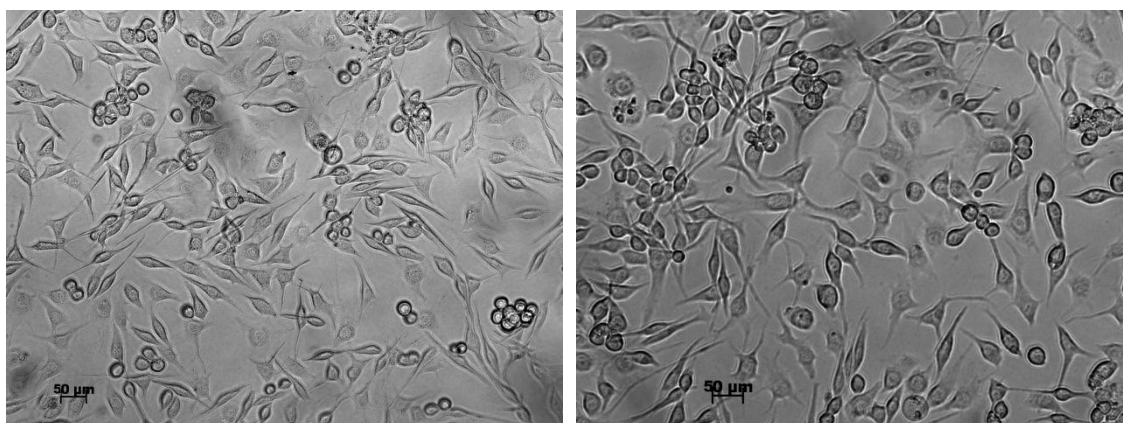


Figura 18. Células BTI-Tn5B1 não infectadas ('Mock'). Escala: Barra = 50µm.

A análise de células BTI-Tn5B1 não infectadas ('Mock') é importante para comparação com as células infectadas e visualização da diferença de morfologia. Células BTI-Tn5B1 'Mock' (Figura 18) possuem como morfologia característica, o formato de gota.

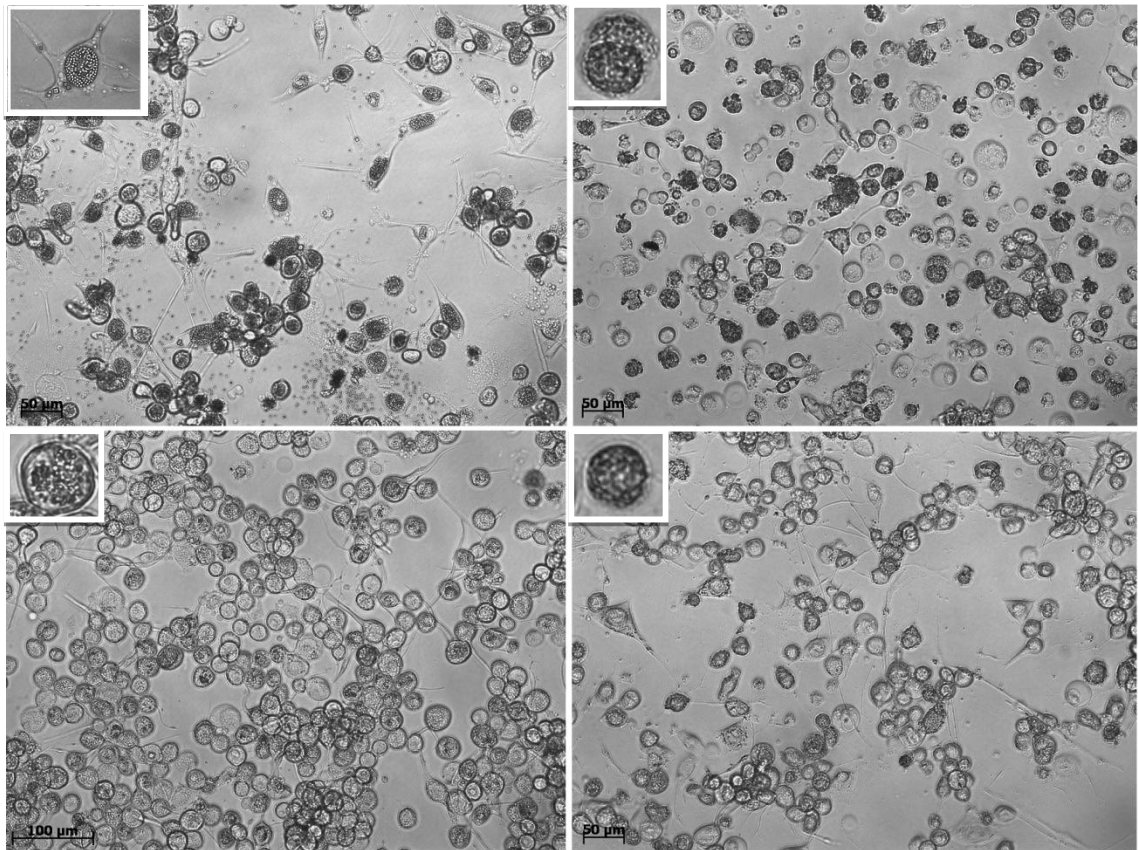


Figura 19. Análise de transfecção de células BTI-Tn5B-4 em microscópio óptico 96 h.p.i. vAc-AP-NS1/DENV1 (superior à esquerda); vAc-AP-NS1/DENV2 (superior à direita); vAc-AP-NS1/DENV3 (inferior à esquerda); vAc-AP-NS1/DENV4 (inferior à direita). Escala: Barra = 50μm.

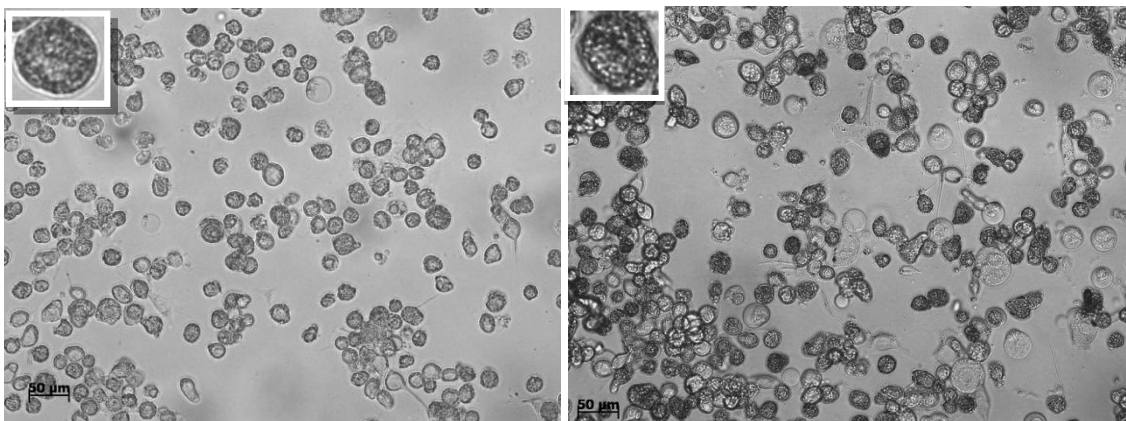


Figura 20. Análise de transfecção de células BTI-Tn5B-4 em microscópio óptico 96 h.p.i. vAc-NS1/DENV1 (à esquerda); vAc-NS1/DENV2 (à direita). Escala: Barra = 50μm.

5.6.2 Infecção

Após indícios da confirmação da transfecção por meio de análise dos sintomas previamente citados, os vírus obtidos e secretados no sobrenadante das células transfectadas foram utilizados na infecção de monocamadas confluentes de células BTI-Tn5B-4. Os sintomas de infecção semelhantes aos sintomas observados na transfecção foram observados 96 h.p.i. (Figura 21).

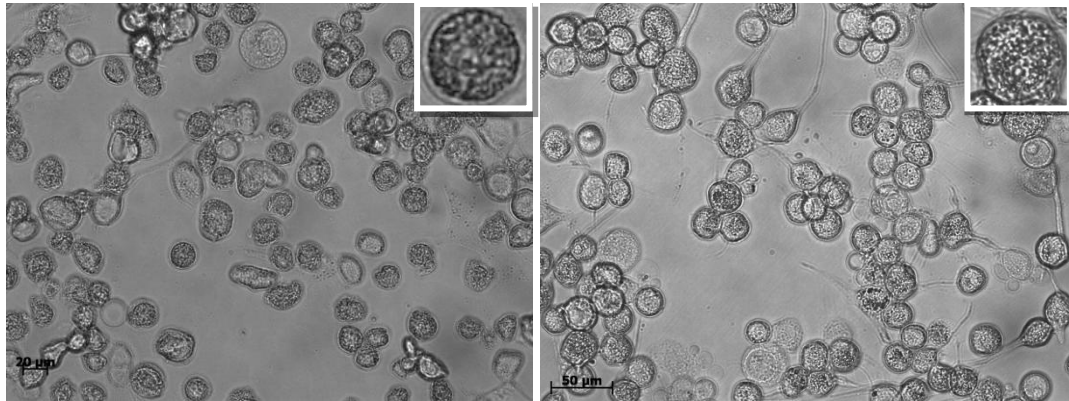


Figura 21. Análise de infecção de células BTI-Tn5B-4 em microscópio óptico 96 h.p.i. vAc-NS1/DENV1 (à esquerda); vAc-AP-NS1/DENV3 (à direita);

5.7 Titulação viral

Após ensaio de titulação por diluição seriada do estoque viral dos vírus: vAc-NS1/DENV1; vAc-NS1/DENV2; vAc-AP-NS1/DENV2; vAc-AP-NS1/DENV3; vAc-AP-NS1/DENV4 (96 h.p.i) todos os 96 poços foram analisados e marcados como infectados ou não infectados por análise visual, após análise estatística dos dados encontrados para cada vírus.

Os títulos virais obtidos para os vírus construídos foram: $1,09 \times 10^5$ pfu/mL para vAc-NS1/DENV1; $1,94 \times 10^5$ pfu/mL para vAc-NS1/DENV2; $1,37 \times 10^5$ pfu/mL para vAc-AP-NS1/DENV2; $1,37 \times 10^5$ pfu/mL para vAc-AP-NS1/DENV3 e $1,21 \times 10^4$ pfu/mL para vAc-AP-NS1/DENV4.

Após passagens seriadas do estoque viral para infecção de novas células e nova titulação, pode-se notar que o título viral não foi alterado.

5.8 Análise de expressão das proteínas obtidas

Na análise do gel SDS-PAGE 12% corado em solução corante azul de Coomassie contendo extratos de células da linhagem BTI-Tn5B-4 transfectadas e infectadas com os vírus recombinantes é notório a presença de bandas fortes de aproximadamente 75 kDa referentes a proteína NS1 (46 kDa) fusionada à poliedrina do baculovírus (29 kDa) para as proteínas expressas por vAc-NS1/DENV1 e vAc-NS1/DENV2 (Figura 23-A). No gel referente às proteínas expressas por vAc-AP-NS1/DENV2, vAc-AP-NS1/DENV3, vAc-AP-NS1/DENV4 pode-se observar uma banda com cerca de 36 kDa, referente a expressão do peptídeo fusionado à poliedrina (Figura 22).

O vírus recombinante vAc-AP-NS1/DENV1 produziu cristais muito semelhantes a poliedros do vírus selvagem AcMNPV (Figura 21) e as proteínas foram visualizadas em gel SDS-PAGE 12% com tamanho abaixo do esperado (cerca de 29kDa), sugerindo que provavelmente ocorreu a expressão do vírus selvagem (AcMNPV), impossibilitando a confirmação da expressão correta de vAc-NS1/DENV1 e posterior utilização da proteína AP-NS1/DENV1, que foi a princípio descartada dos posteriores ensaios (Figura 23-B).

Pela análise de *Western Blotting* pode-se observar somente as bandas previamente citadas, confirmando a correta expressão das proteínas produzidas e especificidade contra o anticorpo anti-His que pode-se ligar a calda de histidina (6xHis) presente em todas as construções realizadas (Figura 22-B).

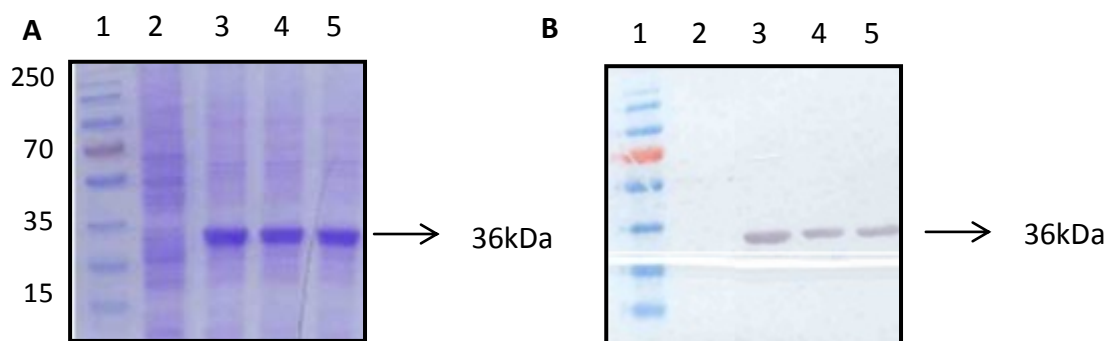


Figura 22. Análise de expressão dos peptídeos imunogênicos em células BTI-Tn5B-4, 96h.p.i. (A) Eletroforese de gel SDS PAGE 12% corado com azul de Coomassie (B) Membrana de *Western Blotting* incubada com anticorpo primário anti-hexa-histidina (6xHis) monoclonal de camundongo (GE Healthcare). 1 – Marcador de massa molecular ‘PageRuler™ Prestained Protein Ladder’ (Fermentas); 2 – Célula não infectada (‘Mock’); 3 – Células infectadas com vAc-AP-NS1/DENV2; 4 – Células infectadas com vAc-AP-NS1/DENV3; 5 – Células infectadas com vAc-AP-NS1/DENV4. Tamanho do peptídeo cerca de 36kDa.

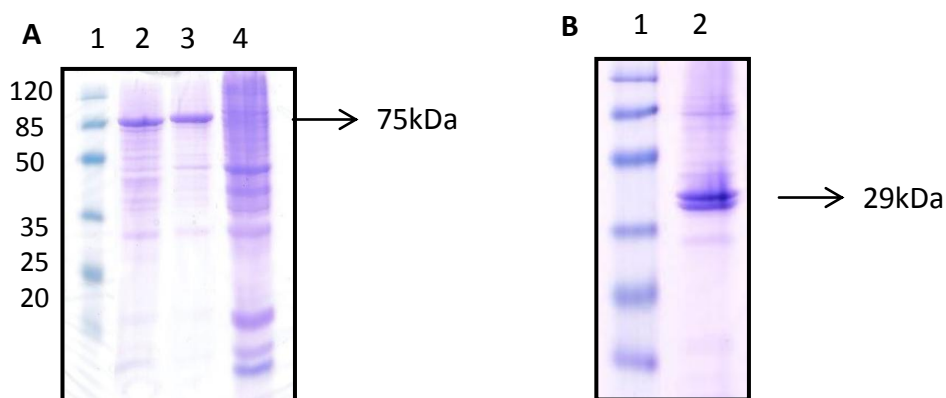


Figura 23. Análise eletroforética dos lisados: NS1-DENV1, NS1-DENV2 e AP-NS1/DENV1 em células BTI-Tn5B-4, 96h.p.i. Eletroforese de gel SDS PAGE 12% corado com azul de Coomassie. (A) Expressão de NS1-DENV1 e NS1-DENV2. 1 – Marcador de massa molecular ‘Prestained Protein Ladder’ (Thermo Scientific); 2 – Células infectadas com vAc-NS1/DENV1; 3 - Células infectadas com vAc-NS1/DENV2; 4 - Célula não infectada (‘Mock’). Tamanho de NS1-DENV cerca de 75kDa. (B) Expressão de AP-NS1/DENV1. 1 – Marcador de massa molecular ‘Prestained Protein Ladder’ (Thermo Scientific); 2 – Células infectadas com vAc-AP-NS1/DENV1. Tamanho de AP-NS1-DENV1 cerca de 29kDa.

5.9 Purificação das proteínas obtidas

Após confirmação da expressão, monocamadas confluentes de células de inseto BTI-Tn5B-4 foram infectada com os baculovírus recombinantes: vAc-NS1/DENV1, vAc-NS1/DENV2, vAc-AP-NS1/DENV2, vAc-AP-NS1/DENV3, vAc-AP-NS1/DENV4 e coletadas 96 h.p.i. Em seguida, o gradiente de sacarose 40-80% foi preparado e as amostras foram ultracentrifugadas conforme descrição prévia. As frações formadas após a ultracentrifugação (Figura 24) foram coletadas e as amostras foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 12% (Figura 25).

Recuperando após a purificação as bandas de tamanho esperado e valor estimado de 75kDa para as proteínas NS1 fusioanadas à poliedrina expressas por vAc-NS1/DENV1, vAc-NS1/DENV2 e de cerca de 36kDa referente aos peptídeos imunogênicos fusionados à poliedrina expressos por vAc-AP-NS1/DENV2, vAc-AP-NS1/DENV3, vAc-AP-NS1/DENV4. Além da banda de cerca de 29kDa referente a poliedrina sozinha expressa pelo vírus construído com o vetor pFB1-6xHis-AcPH sem inserto: vAc-AcPH (Figura 25).

Houve, no entanto, o aparecimento de bandas inespecíficas indicado que a purificação não foi total e que ocorreu degradação proteica, observada na membrana de *Western Blotting* incubada com anticorpo primário anti-hexa-histidina (6xHis) monoclonal de camundongo (GE Healthcare), principalmente para a purificação de NS1 completa tanto de DENV-1, quanto de DENV-2 (Figura 25-B).

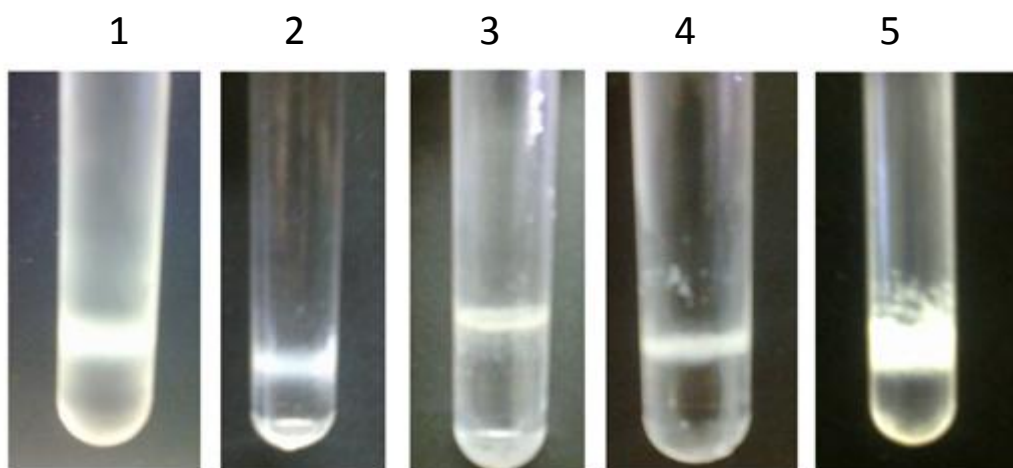


Figura 24. Frações formadas após ultracentrifugação de proteínas recombinantes. 1 - NS1/DENV1; 2 - NS1/DENV2; 3 - AP-NS1/DENV2; 4 - AP-NS1/DENV3; 5 - AP-NS1/DENV4.

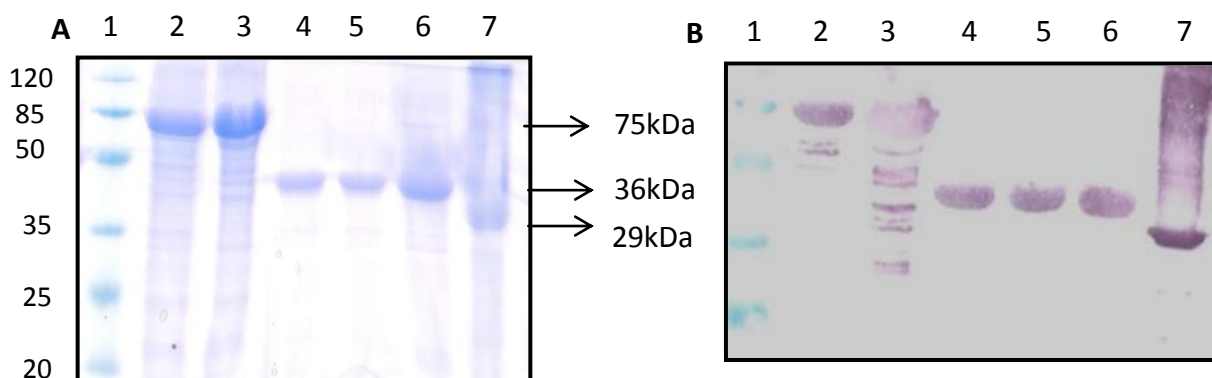


Figura 25. Purificação proteica por gradiente de sacarose 80-40% de NS1-DENV1-2 e AP-NS1-DENV2-4. (A) Análise eletroforética de purificados em gel SDS PAGE 12% corado com azul de Coomassie (B) *Western Blotting* incubada com anticorpo primário anti-hexahistidina (6xHis) monoclonal de camundongo (GE Healthcare). 1 – Marcador de massa molecular ‘EZ-Run Prestained Protein Marker’ (Fisher BioReagents); 2 – NS1-DENV1; 3 – NS1-DENV2; 4 – AP-NS1-DENV2; 5 – AP-NS1-DENV3; 6 – AP-NS1-DENV4; 7 – AcMNPV expressando a poliedrina (29kDa). Tamanho de NS1-DENV cerca de 75kDa. Tamanho de AP-NS1-DENV1 cerca de 36kDa.

5.10 MEV

Na análise visual por MEV dos cristais proteicos formados pela expressão de vAc-AP-NS1/DENV2, vAc-AP-NS1/DENV3, vAc-AP-NS1/DENV4 em células de inseto BTI-Tn5B-4 após purificação por gradiente de sacarose 40-80%, pode-se notar que apesar das proteínas expressas possuírem o mesmo tamanho em kDa, para da cada construção há uma conformação e um tamanho de cristal diferente. Os cristais formados pela proteína AP-NS1/DENV3 são notavelmente menores que os cristais de AP-NS1/DENV2 e AP-NS1/DENV4 (Figura 26).

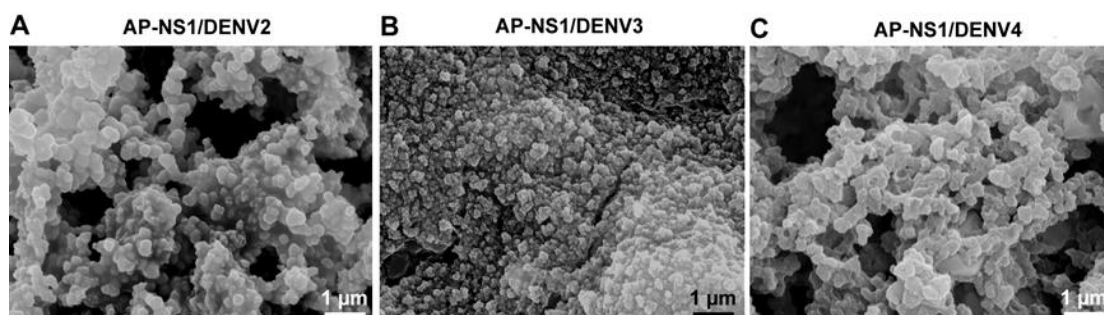


Figura 26. MEV dos cristais proteicos formados pela expressão das proteínas: AP-NS1/DENV2, AP-NS1/DENV3, AP-NS1/DENV4. Escala: Barra = 1µm.

5.11 Alinhamento das sequências de aminoácidos dos peptídeos imunogênicos

A análise da sequência de aminoácidos dos quatro peptídeos construídos foi realizada para tentar encontrar um parâmetro que levasse a explicação relacionada à diferença tanto morfológica quanto de tamanho dos cristais formados, principalmente pelo peptídeo de DENV-3 (AP-NS1-DENV3), quando comparado aos peptídeos AP-NS1-DENV2 e AP-NS1-DENV4 analisados por MEV.



Figura 27. Alinhamento das sequências de aminoácidos dos peptídeos imunogênicos, considerando à polaridade (A), hidrofobicidade (B) e estrutura secundária (C) realizada no Geneious® 6.1.4.

A diferença encontrada entre a sequência de D3-AP-NS1 e as três demais sequências: D1-AP-NS1, D2-AP-NS1 e D4-AP-NS1 foram uma Arginina (A), aminoácido polar e básico, no décimo sexto aminoácido das sequências; Isoleucina (I), hidrofóbico, no vigésimo oitavo; Ácido glutâmico (E), polar com carga nula, no quadragésimo segundo e Treonina (T), polar com carga nula, no quadragésimo sétimo. Na análise da estrutura secundária pode-se destacar uma folha β entre o trigésimo e quadragésimo aminoácido na sequência de D3-AP-NS1 maior que a folha β observada nas outras três sequências (Figura 27).

A análise da estrutura terciária dos quatro peptídeos fusionados à poliedrina e a calda de histidina não revelou diferença significativa na estrutura, provavelmente devido a curta extensão dos peptídeos (70 aminoácidos e 7kDa) quando comparados à proteína inteira formada (325 aminoácidos e 36kDa) (Figura 28).

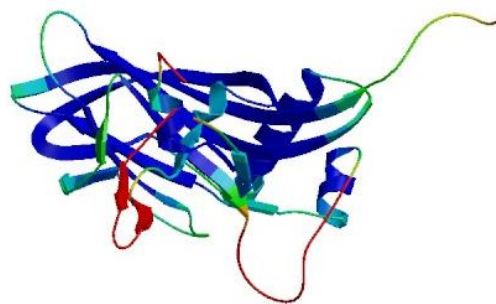


Figura 28. Previsão da estrutura terciária de D3-AP-NS1 por SWISS-MODEL (Disponível em: <<http://swissmodel.expasy.org/workspace>> Acesso em: jul de 2013).

5.12 Imunização

As imunizações, o sacrifício dos animais e a coleta de sangue por punção cardíaca foram corretamente realizados segundo o Comitê de Ética em Pesquisa Animal.

As proteínas NS1/DENV1 (767 µg/ml) e AP-NS1/DENV4 (986 µg/ml) foram concentradas em Speed vac SC110 (Savant®) até atingirem uma concentração de 1.000 µg/ml.

Quatro animais foram utilizados no total, dois deles foram imunizados com NS1/DENV1 e os outros dois com AP-NS1/DENV4.

Após os 45 dias de procedimento e três imunizações com 200 µg (200 µl) cada, totalizando 600 µg (600 µl) de proteína por animal, 5 ml de sangue foram coletados, coagulados e centrifugados, obtendo um rendimento de aproximadamente 3 ml de soro para cada animal utilizado.

5.13 Purificação de IgG

Para a purificação de IgG presente no soro dos animais imunizados, os plasmas contendo os anticorpos de interesse foram tratados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amônio) e dialisados com PBS 0,5x pH=7,2, em seguida, foram aplicados em coluna DEAE-Sephacel (GE Healthcare, Life Sciences) e eluídos com PBS 0,5x pH=6,5.

Cinco frações de 1 ml cada foram coletadas e a absorbância de NS1/DENV1 de um plasma coletado foi analisada em Espectrofotômetro (SmartSpec Plus, Bio-rad), com parâmetro esperado de $E_{0,1\%} = 1,4$ em UV 280nm.

Das cinco frações coletadas de NS1/DENV1 de um dos plasmas coletados, a primeira obteve $\text{OD}_{600} = 1,702$ e concentração 1,21 mg/ml, seguido de $\text{OD}_{600} = 2,642$ e concentração 1,89 mg/ml para a segunda fração, $\text{OD}_{600} = 0,822$ e concentração 0,59 mg/ml para a terceira fração. Os outros três plasmas obtidos um de NS1/DENV1 e outros dois de AP-NS1/DENV4 seguiram o mesmo padrão de absorbância, portanto, a segunda fração com maior absorbância e concentração em todas as amostras testadas foi escolhida para análise por *Western Blotting* e análises posteriores.

5.14 *Western Blotting* com IgG produzido

Para análise da correta produção do anticorpo através da imunização de ratos com as proteínas recombinantes NS1/DENV1 e AP-NS1/DENV4 foi realizado um *Western Blotting* em que foram comparados três parâmetros: a ligação da proteína recombinante aos anticorpos primários anti-hexa-histidina (6xHis) monoclonal de camundongo (1:3.000); aos antissoros obtidos do ratos imunizados (1:1.000) e aos anticorpos obtidos e purificados dos ratos imunizados (1:1.000).

Como esperado e, portanto, utilizado com uma espécie de controle positivo os anticorpos primários anti-hexa-histidina (6xHis) monoclonal de camundongo geraram sinal positivo (banda forte) contra as proteínas recombinantes: NS1/DENV1 (74kDa) e AP-NS1/DENV4 (36kDa) (Figura 29-A).

Os antissoros obtidos foram capazes de se ligar a proteína recombinante NS1/DENV1 (74kDa) e AP-NS1/DENV4 (36kDa) e gerar bandas (Figura 29-B, 29-C), no entanto, com uma intensidade menor que aos anticorpos primários anti-hexa-histidina (6xHis) monoclonal de camundongo, como esperado, já que o segundo é um anticorpo comercial.

Os anticorpos obtidos (IgG purificado dos ratos imunizados) não foram capazes de se ligar as proteínas recombinantes em uma intensidade suficiente para produzir banda durante o *Western Blotting*, indicando que o título viral obtido foi, provavelmente, abaixo do esperado.

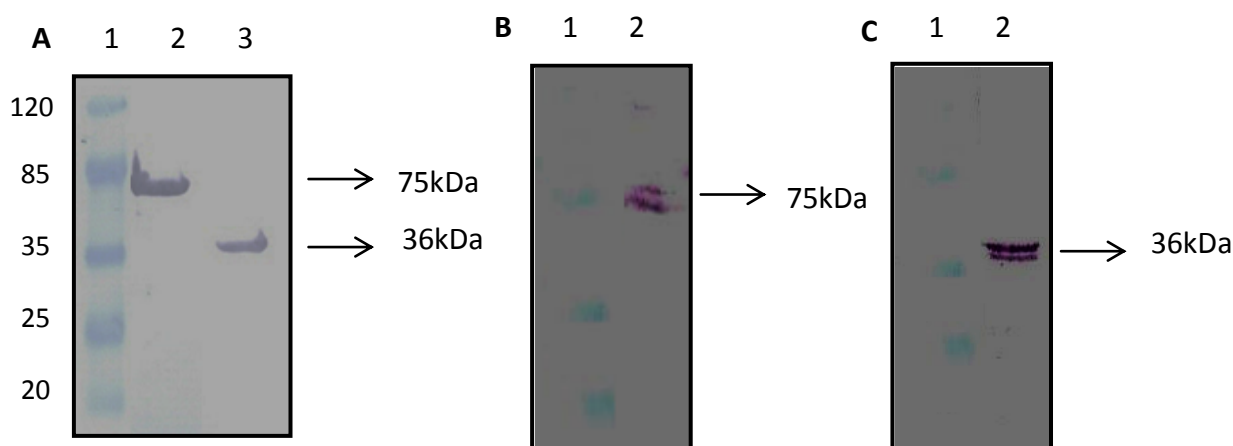


Figura 29. *Western Blotting* contendo proteínas recombinantes NS1/DENV1 (75kDa) e AP-NS1/DENV4 (36kDa). (A) Membrana incubada com anticorpo primário anti-hexa-histidina (6xHis) monoclonal de camundongo(1:3.000). 1 – Marcador de massa molecular ‘EZ-Run Prestained Protein Marker’ (Fisher BioReagents); 2 – NS1/DENV1; 3 - NS1/DENV4. (B) Membrana incubada com antissoro obtido de rato imunizado com NS1/DENV1 (1:1.000). 1 – Marcador de massa molecular ‘EZ-Run Prestained Protein Marker’ (Fisher BioReagents); 2 – NS1/DENV1; (C) Membrana incubada com antissoro obtido de rato imunizado com AP-NS1/DENV4 (1:1.000) 1 – Marcador de massa molecular ‘EZ-Run Prestained Protein Marker’ (Fisher BioReagents); 2 – AP-NS1/DENV4.

5.15 Padronização de ELISA indireto

Para a padronização do ELISA indireto, alguns parâmetros foram alterados com o intuito de otimizar o teste e conseguir um balanço aceitável entre controle positivo e negativo. Os parâmetros alterados foram: quantidade de proteína por reação para a sensibilização da placa (1µg, 2 µg e 5µg), tempo de bloqueio (30 min e 1 hora), diluição do soro humano (1:10 e 1:40), diluição do anticorpo anti-IgG humano conjugado (1:500 e 1:1000) e tempo de revelação com substrato ABTS e peroxidase (30 min e 1 hora).

Testes pilotos foram realizados e absorbância foi aferida chegando ao teste padrão com melhor resultado englobando os seguintes parâmetros: 5 µg de proteína por poço durante a sensibilização da placa, tempo de bloqueio de 30 min, diluição de soro humano de 1:10, diluição do anticorpo anti-IgG humano conjugado de 1:1000 e tempo de revelação com substrato ABTS e peroxidase de 1 hora.

5.16 ELISA indireto

Após a padronização foram realizados testes de ELISA indiretos com o intuito de analisar a sensibilidade de cada peptídeo utilizado frente aos soros contendo DENVs de diferentes sorotipos, previamente diagnosticados por RT-PCR e/ou isolamento viral. Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 5 µg dos peptídeos construídos: AP-NS1/DENV2, AP-NS1/DENV3, AP-NS1/DENV4, separadamente, incubadas com soro humano de paciente infectado com DENV-1 ou DENV-2 ou DENV-3 ou DENV-4.

Foram analisadas três placas, a primeira foi sensibilizada com o peptídeo AP-NS1/DENV2 e incubada com vinte e quatro soros diferentes de DENV-2, seis soros de DENV-1, seis soros de DENV-3, seis soros de DENV4, além dos controles negativos: seis soros negativos (NEG), seis soros humanos normais (SHN) e seis PBS 1X pH=7,4, totalizando sessenta poços. As vinte e quatro amostras de soro de DENV-2 e seis amostras de soro de DENV-1 foram positivas, cinco das seis amostras de soro de DENV-3 e DENV-4, também foram positivas, portanto, das quarenta e oito amostras analisadas, quarenta e seis foram positivas (acima do *cut-off* de OD=0,192), atingindo 95,2% de sensibilidade para esta placa (Figura 30).

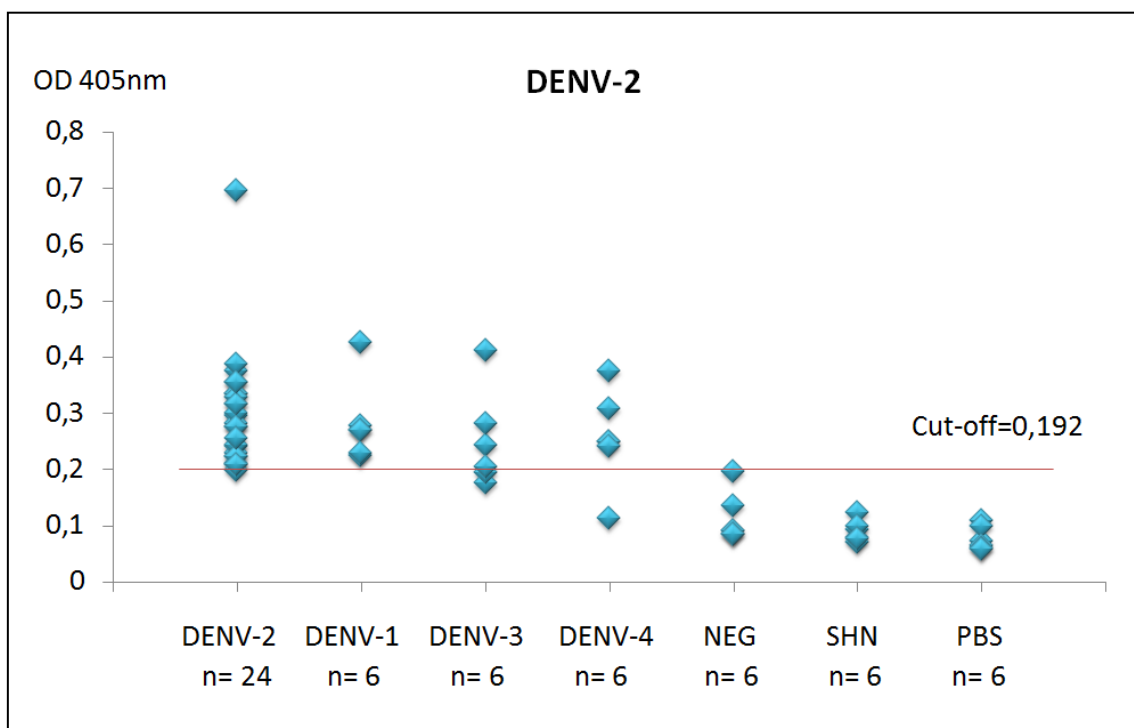


Figura 30. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com peptídeo AP-NS1-DENV2. Eixo Y – absorbância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV1-4 (soro prevalente: DENV-2, n= 24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

A segunda placa foi sensibilizada com o peptídeo AP-NS1/DENV3 e incubada com vinte e quatro soros diferentes de DENV-3, seis soros de DENV-1, seis soros de DENV-2, seis soros de DENV-4, incluindo os mesmos controles negativos. Todas as quarenta e duas amostras testadas foram positivas (acima do *cut-off* OD=0,285), atingindo 100% de sensibilidade para esta placa (Figura 31).

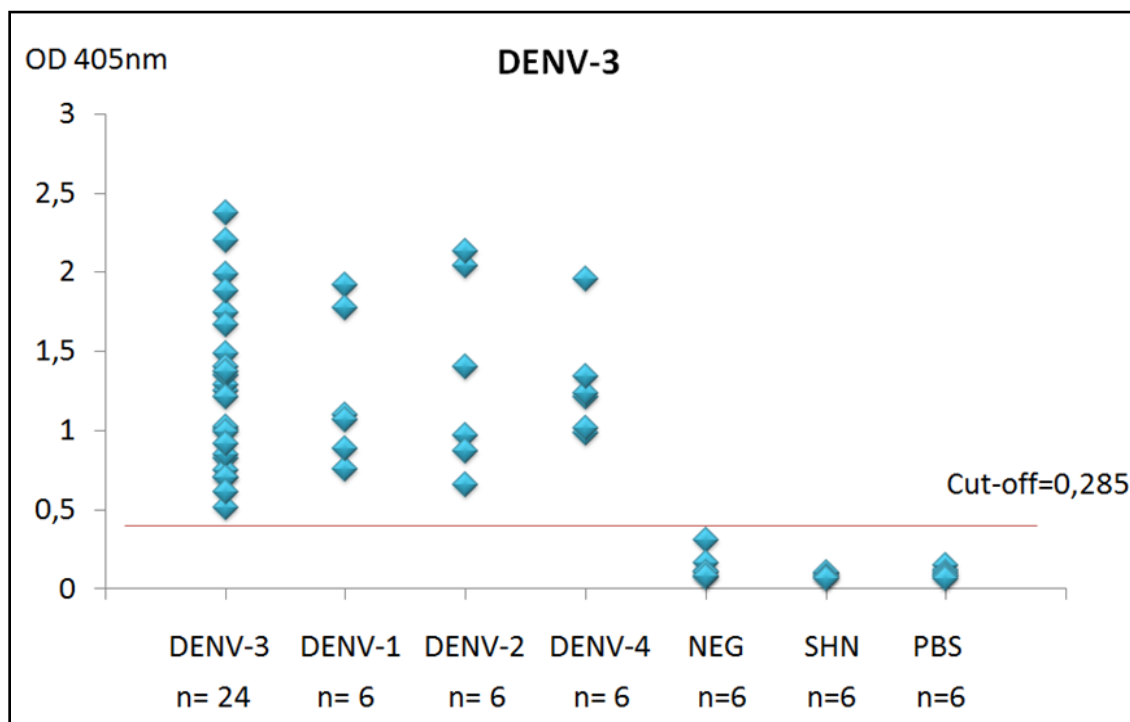


Figura 31. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com peptídeo AP-NS1-DENV3. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV1-4 (soro prevalente: DENV-3, n= 24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

Por fim, a terceira placa foi sensibilizada com o peptídeo AP-NS1/DENV4 e incubada com vinte e quatro soros diferentes de DENV-4, seis soros de DENV-1, seis soros de DENV-2, seis soros de DENV-3, além dos mesmos controles negativos. Todas as quarenta e duas amostras testadas foram positivas (acima do *cut-off* de OD= 0,053), atingindo 100 % de sensibilidade para esta placa (Figura 32).

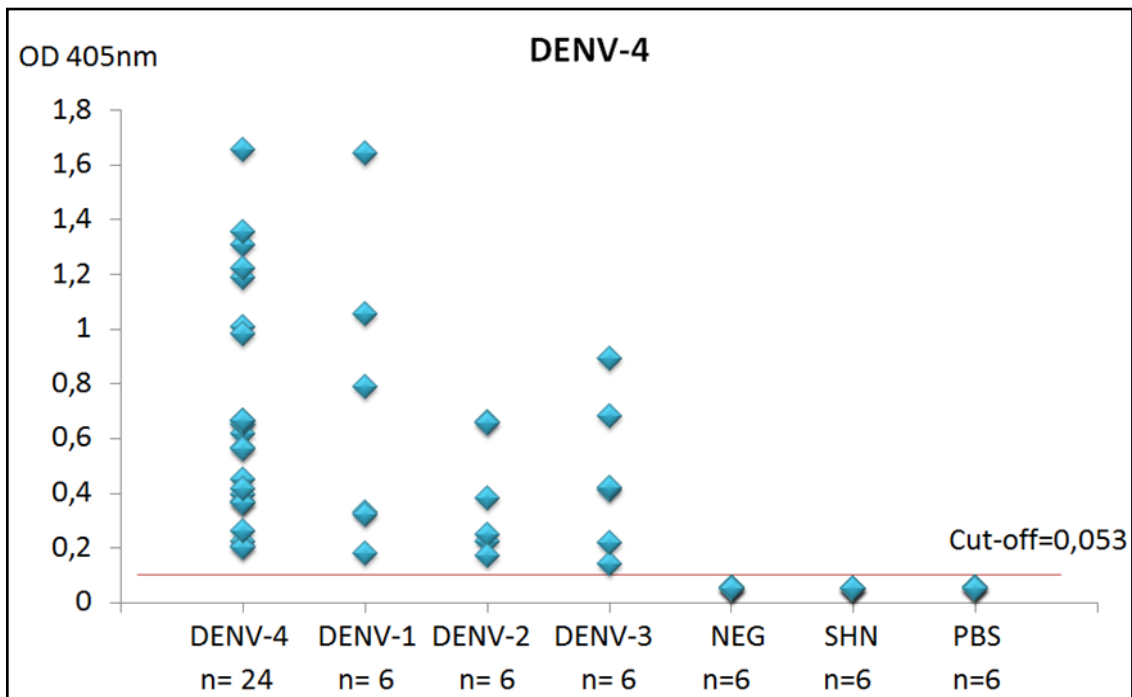


Figura 32. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com peptídeo AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV1-4 (soro prevalente: DENV-4, n= 24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

As três placas testadas totalizaram 126 análises, com 124 positivas (acima do *cut-off* referente a cada placa), atingindo uma sensibilidade de 98,4 %, demonstrando a eficiência do peptídeo frente aos soros testados e a reatividade cruzada entre os sorotipos de DENV.

Em seguida, os peptídeos foram analisados em conjunto, as placas foram sensibilizadas com a mistura dos três peptídeos: DENV-2, DENV-3, DENV-4, representando o protótipo do kit desenvolvido. 309 amostras foram testadas, dentre elas 65 para DENV-1, 79 para DENV-2, 79 para DENV-3 e 86 para DENV-4, das quais 64 foram positivas para DENV-1, 78 para DENV-2, 71 para DENV-3 e 85 para DENV-4, somando 289 amostras positivas. Obtendo desta maneira, 98,4 % de sensibilidade para DENV-1, 98,7 % para DENV-2, 89,8 % para DENV-3 e 98,8 % para DENV-4. De maneira geral o teste obteve 96,4% de sensibilidade, (Figuras 33-36) e tabela 13.

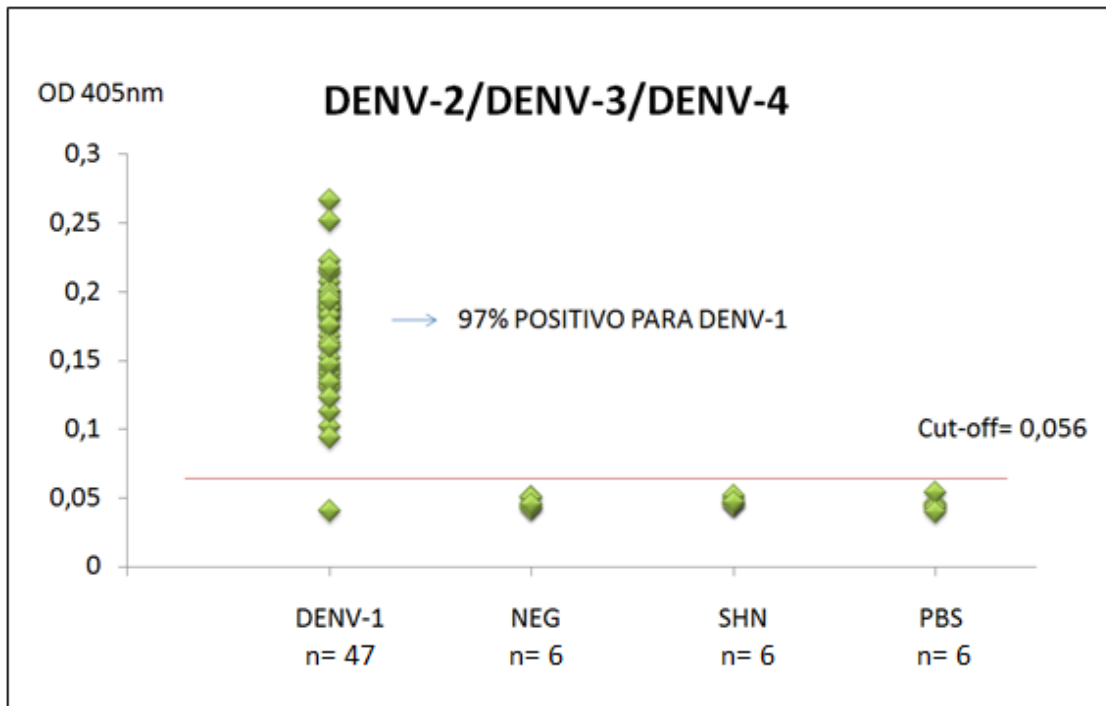


Figura 33. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-1 e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

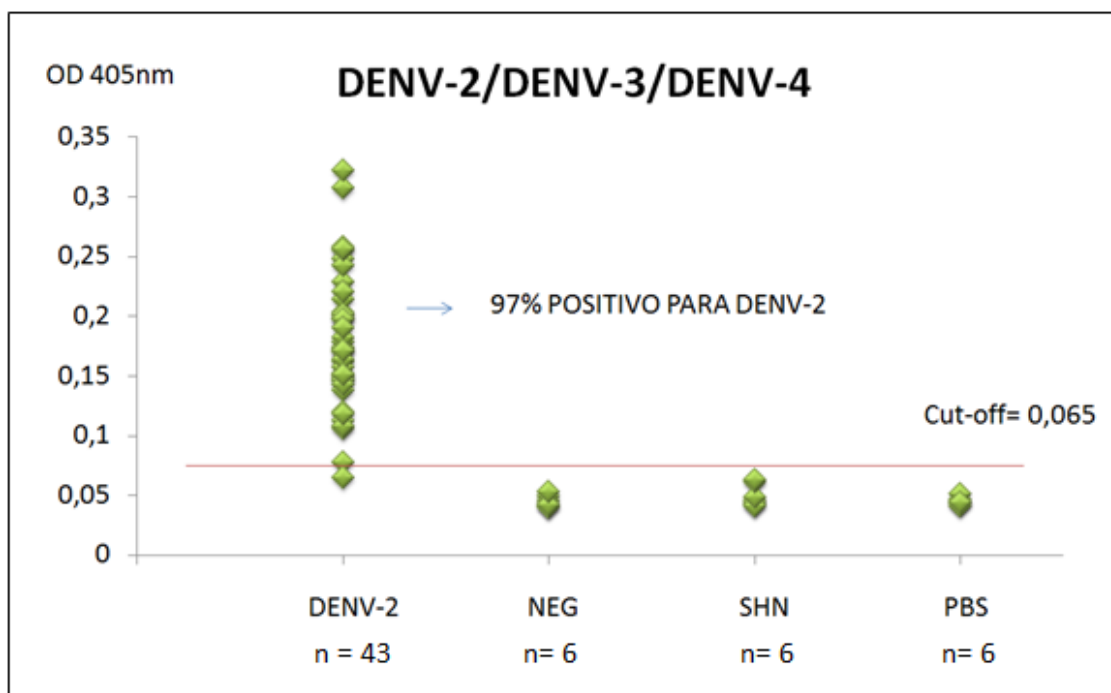


Figura 34. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-2 e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros

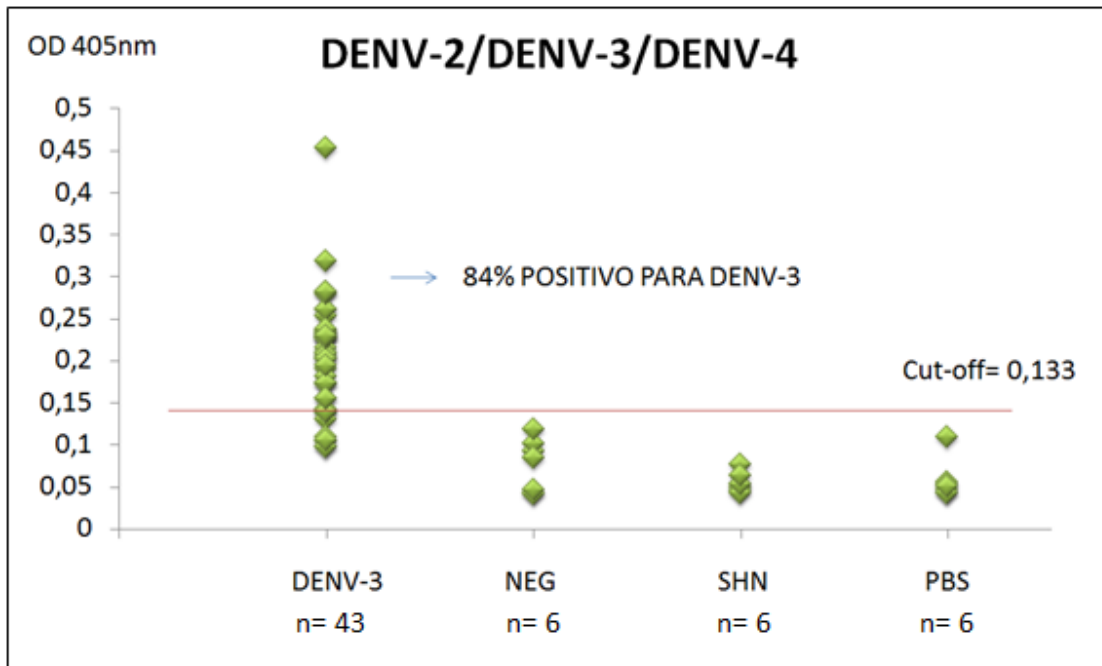


Figura 35. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-3 e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

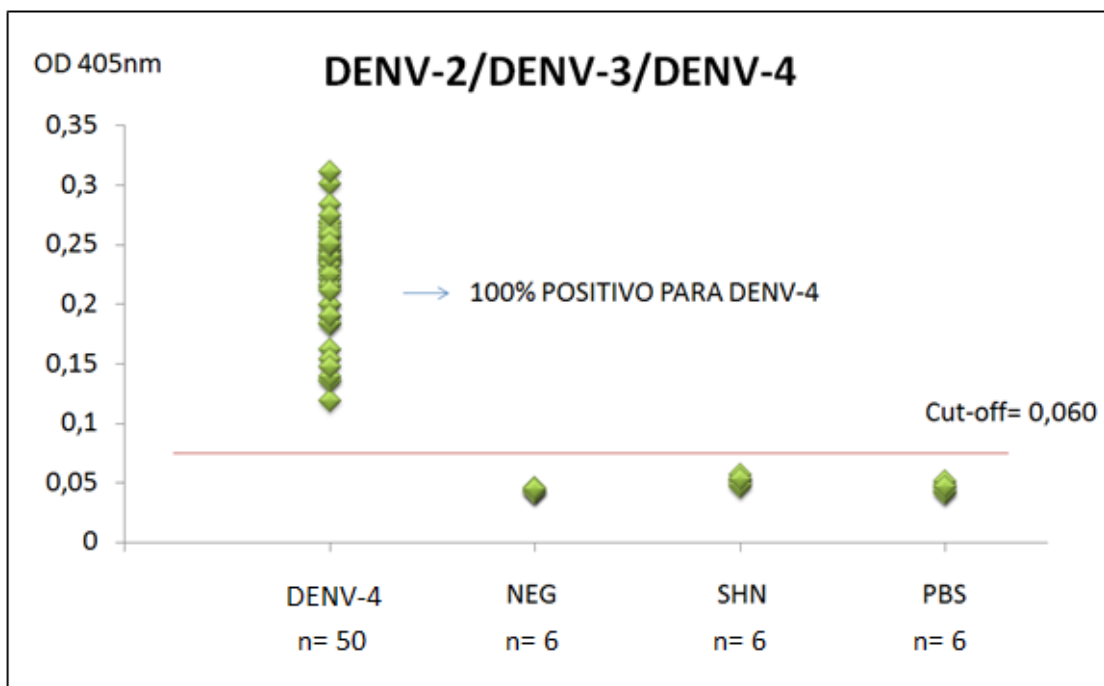


Figura 36. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-4 e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

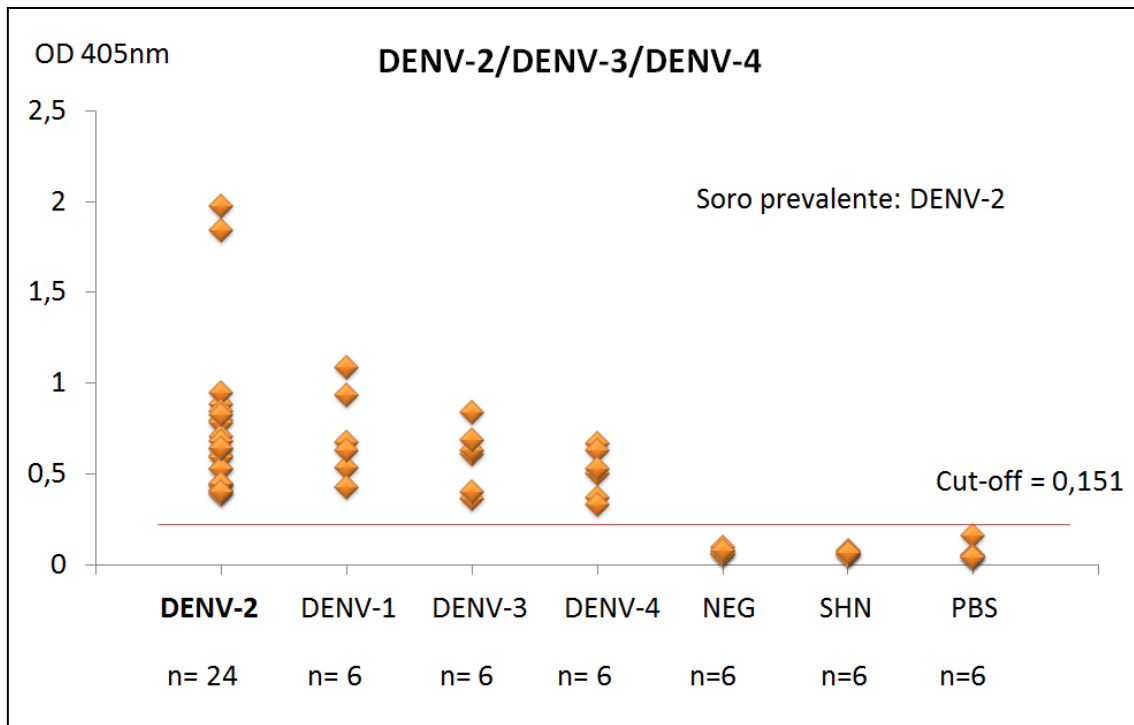


Figura 37. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-1-4 (soro prevalente: DENV-2, n= 24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

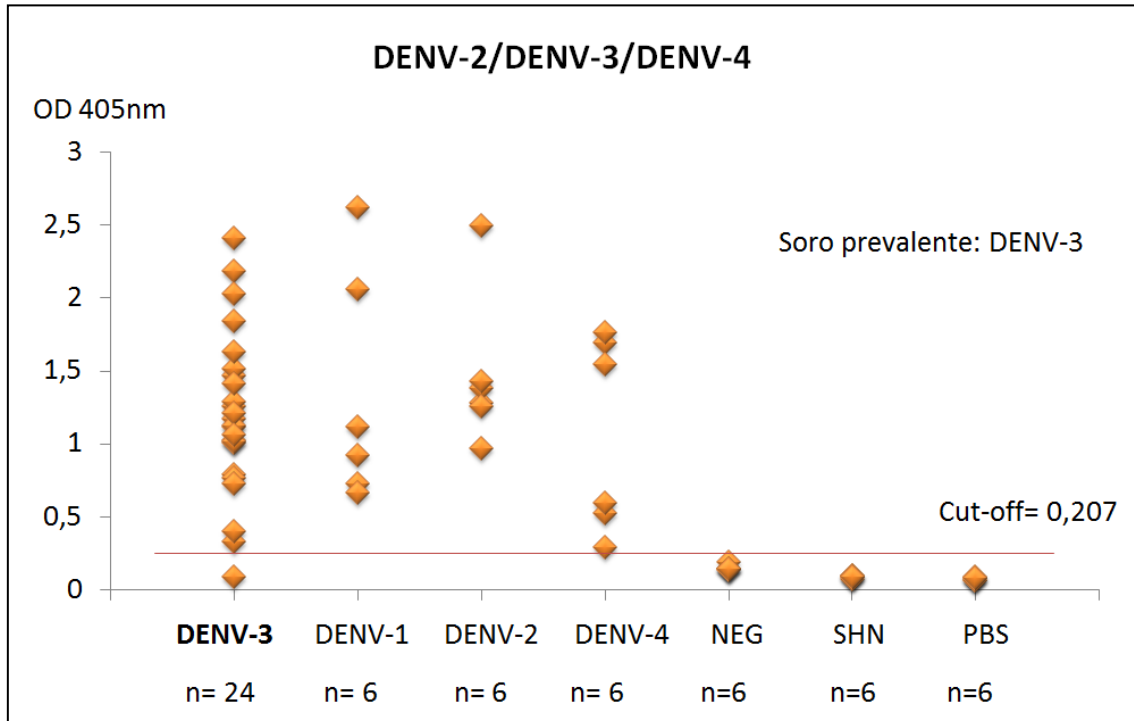


Figura 38. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-1-4 (soro prevalente: DENV-3, n=24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

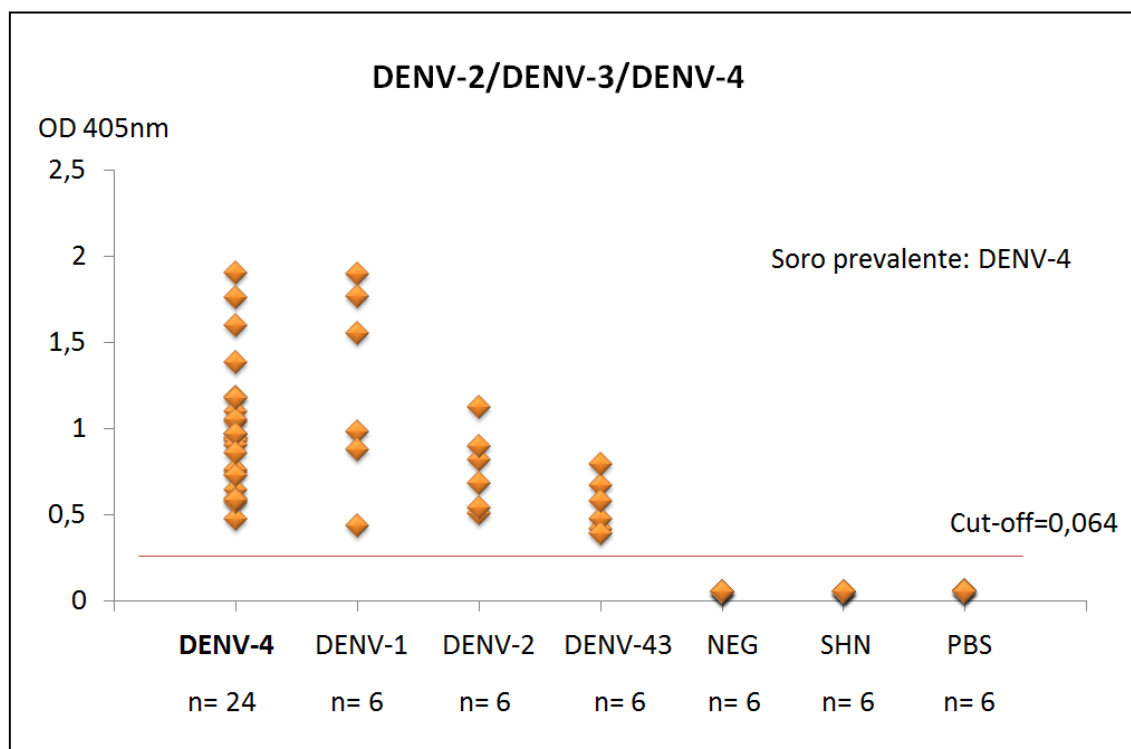


Figura 39. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizada com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - Soros de pacientes infectados com DENV-1-4 (soro prevalente: DENV-4, n=24) e controles negativos: soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

Tabela 11. Análise de sensibilidade das placas de ELISA indireto sensibilizadas com a mistura dos três peptídeos: AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4.

Sorotipo	Nº de amostras	Nº de amostras positivas	Sensibilidade do teste
DENV-1	65	64	98,4%
DENV-2	79	78	98,7%
DENV-3	79	71	89,8%
DENV-4	86	85	98,8%
Total	309	298	96,4%

Para análise de especificidade, 60 amostras negativas foram testadas em placas sensibilizadas com os peptídeos individualmente e com a mistura dos três peptídeos. Todas as amostras foram negativas, com resultados bem abaixo do valor médio de cut-off de todos os testes previamente realizados (Média de *cut-off* de OD= 0,119). O teste, portanto, obteve 100 % de especificidade (Figura 40).

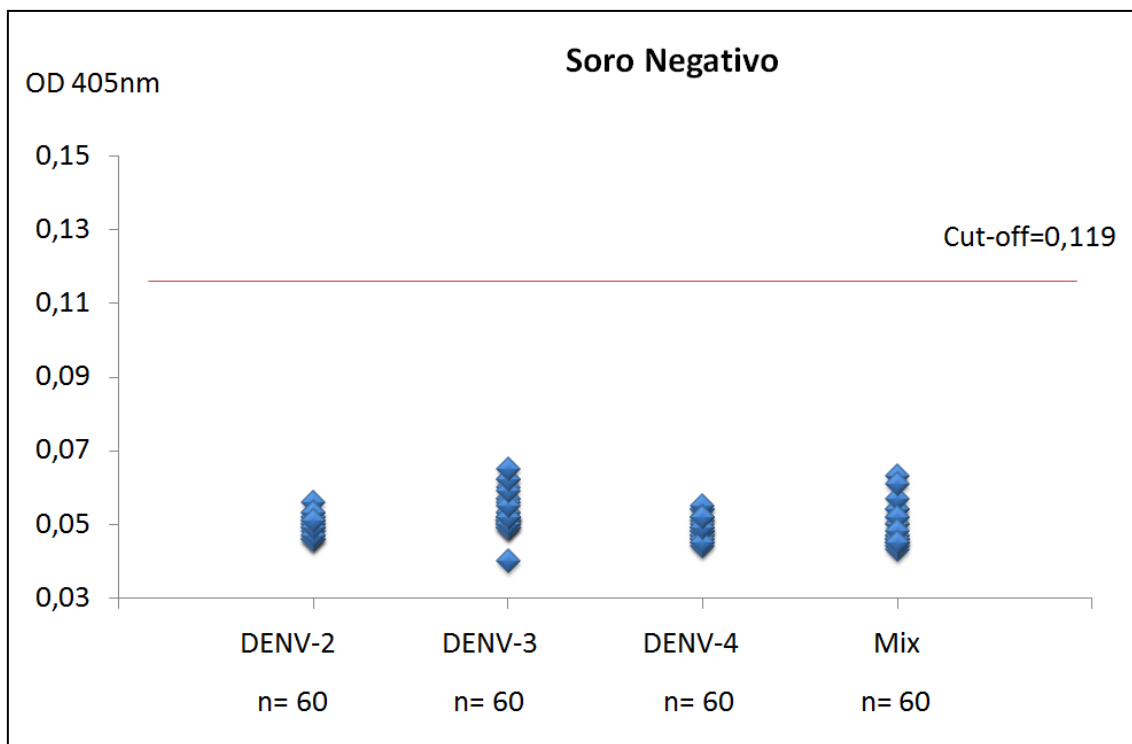


Figura 40. ELISA indireto de quatro placas de 96 poços sensibilizadas com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4, separadamente e com a mistura dos três (Mix) e incubada com soro negativo. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X – Sensibilização da placa com os peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4 e mistura dos três (Mix). n = número de soros testados.

Por fim, foram realizadas análises de reatividade cruzada, por meio da sensibilização de placas de 96 poços com os peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4, separadamente e com a mistura dos três, incubados com soro de pacientes previamente diagnosticados com Febre Amarela, Sarampo e Rubéola. Os resultados apresentaram valores altos para os controles negativos: pacientes saudáveis (NAIVE), soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4, o que fez com que o *cut-off* subisse, deixando as amostras de Febre Amarela, Sarampo e Rubéola testadas, que também apresentaram valores altos, abaixo do *cut-off*. Portanto, não houve reatividade cruzada com as amostras analisadas (Figuras 41-44). O valor de VPP foi de 1,0 ou 100 %, já que não foram detectadas amostras FP e de VPN foi de 0,96 ou 96 %, considerando 11 amostras foram FN.

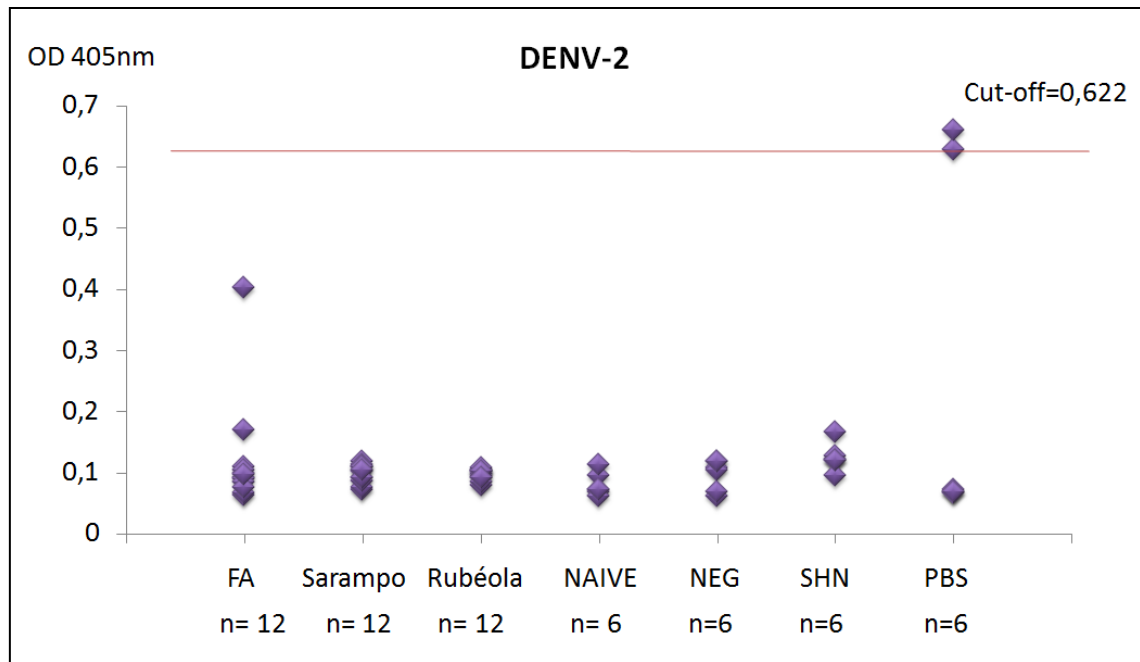


Figura 41. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizadas com o peptídeo AP-NS1-DENV2 e incubada com soro de paciente diagnosticado com Febre Amarela (FA), Sarampo e Rubéola. Eixo Y – absorbância obtida com OD 405nm. Eixo X – Soro de FA, Sarampo e Rubéola, controles negativos: pacientes saudáveis (NAIVE), soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

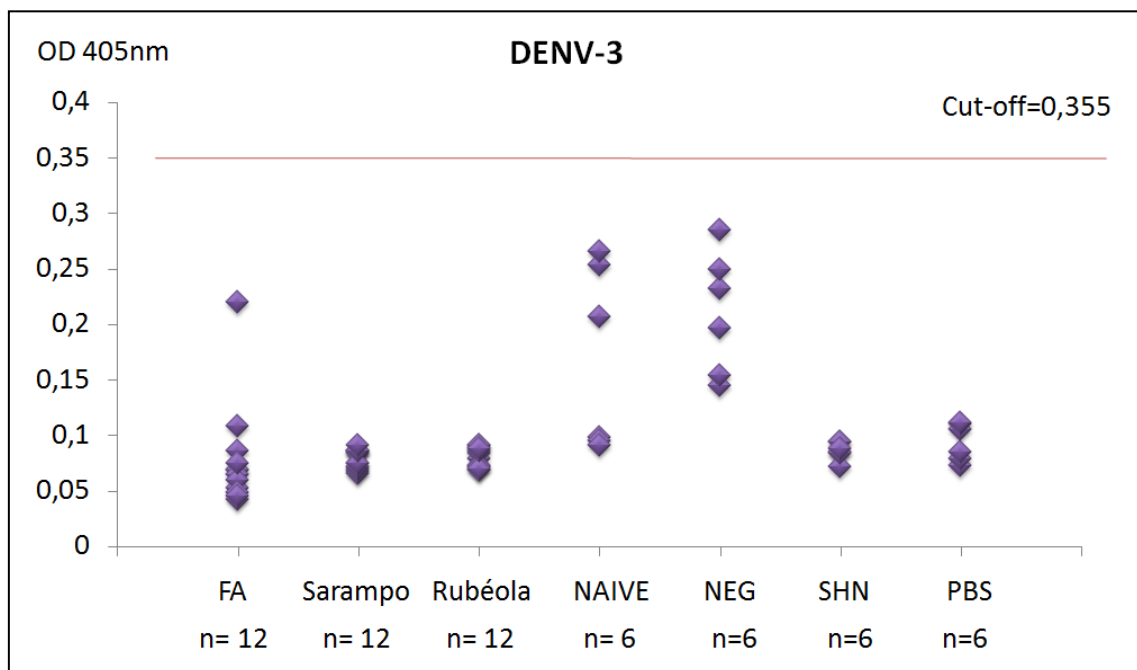


Figura 42. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizadas com o peptídeo AP-NS1-DENV3 e incubada com soro de paciente diagnosticado com Febre Amarela (FA), Sarampo e Rubéola. Eixo Y – absorbância obtida com OD 405nm. Eixo X – Soro de FA, Sarampo e Rubéola, controles negativos: pacientes saudáveis (NAIVE), soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

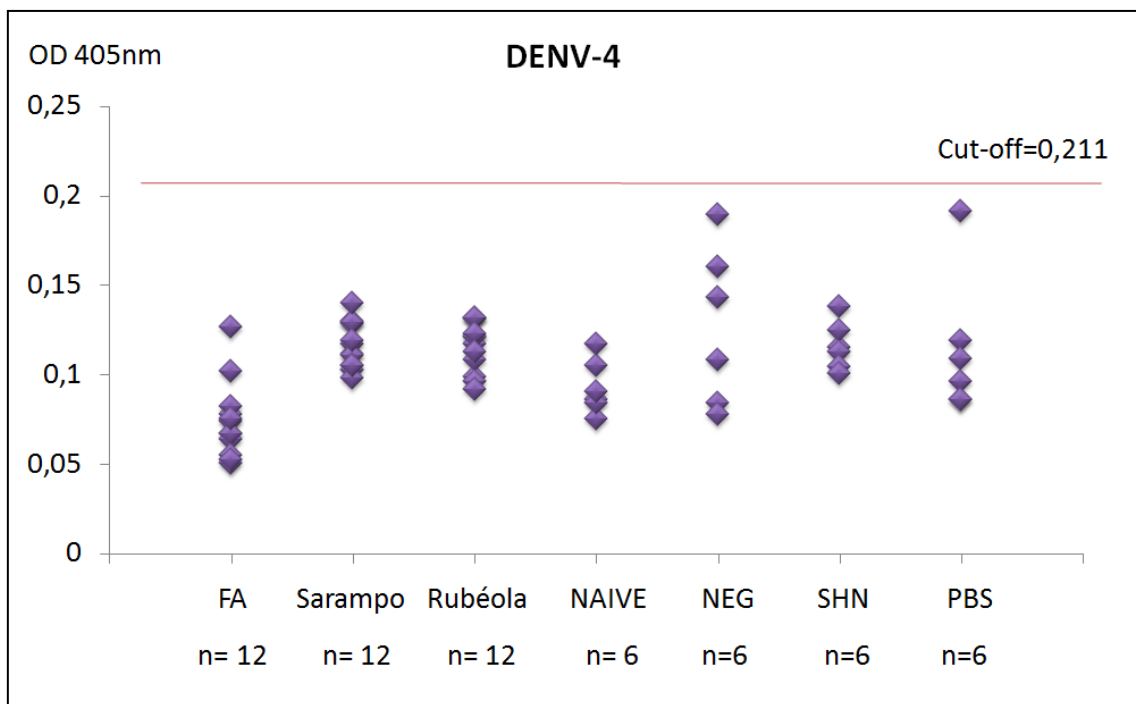


Figura 43. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizadas com o peptídeo AP-NS1-DENV4 e incubada com soro de paciente diagnosticado com Febre Amarela (FA), Sarampo e Rubéola. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X – Soro de FA, Sarampo e Rubéola, controles negativos: pacientes saudáveis (NAIVE), soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

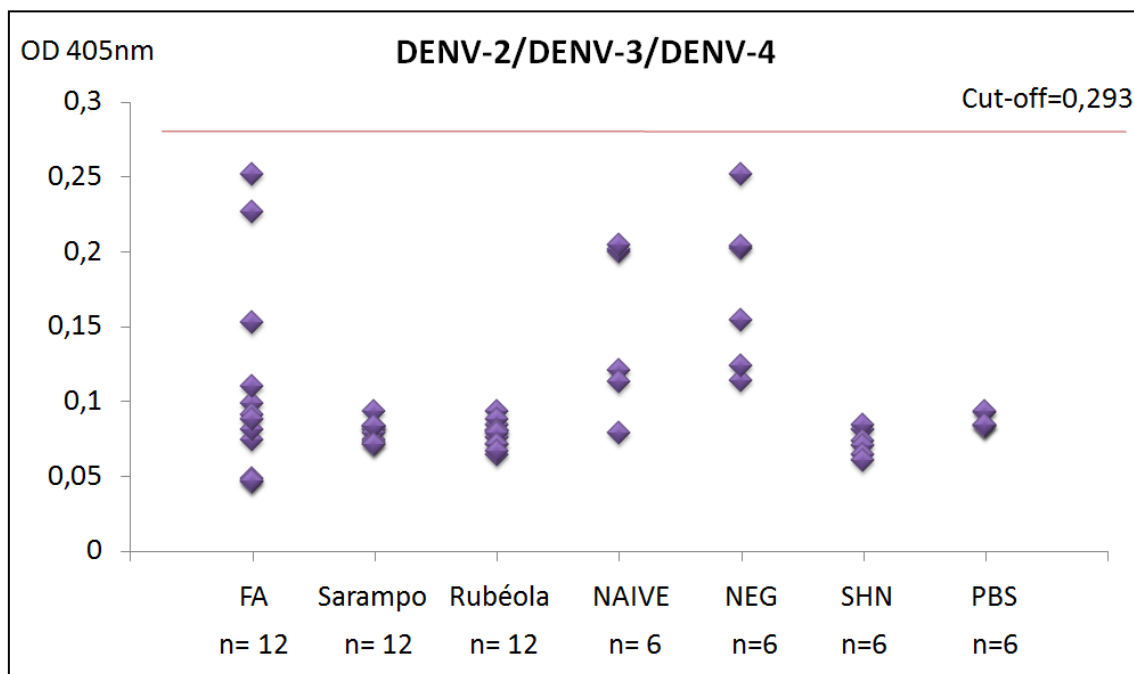


Figura 44. ELISA indireto de placa de 96 poços sensibilizadas com os três peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3, AP-NS1-DENV4 e incubada com soro de paciente diagnosticado com Febre Amarela (FA), Sarampo e Rubéola. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X – Soro de FA, Sarampo e Rubéola, controles negativos: pacientes saudáveis (NAIVE), soros negativos (NEG), soros humanos normais (SHN) e tampão PBS 1X pH=7,4. n = número de soros testados.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho se dispôs a desenvolver um sistema de diagnóstico de infecção por DENV, através da expressão de proteínas recombinantes de NS1. Estas proteínas recombinantes podem ser utilizadas para detecção de anticorpos anti-NS1 presentes em soro de paciente infectados. Para isso, peptídeos imunogênicos de NS1 dos quatro sorotipos de DENV foram expressos utilizando sistema baculovírus/célula de inseto, purificados e usados em ELISA indireto para captura de anticorpos anti-NS1 no soro de pacientes infectados com dengue, previamente confirmados por RT-PCR e/ou isolamento viral. Além disso, a proteína completa NS1 de DENV-1 foi expressa usando mesma estratégia e usada para produção de antissoros em modelo murino. O peptídeo imunogênico para NS1 de DENV4 também foi usado em imunização.

Crucialmente, a escolha da região de NS1 de DENV (aminoácidos 57 a 126) que serviu de base para a construção dos peptídeos imunogênicos foi baseada nos dados do estudo apresentado por MASON et al, 1990 que detectou múltiplos determinantes antigênicos no segmento de NS1 de DENV-1 entre os resíduos de aminoácidos 57 e 126 e testou anticorpos monoclonais previamente construídos pelos autores contra diferentes regiões de NS1 de DENV-1. Os dados encontrados foram extrapolados para os outros três sorotipos devido à similaridade das sequências.

A confirmação das expressões das proteínas heterólogas NS1-DENV1, NS1-DENV2, AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3 e AP-NS1-DENV4 em célula de inseto foi realizada por microscopia óptica, uma vez que a poliedrina fusiona a proteínas heterólogas forma corpos de inclusão proteicos semelhantes a cristais. As células apresentaram morfologia característica de infecção por baculovirus como perda da morfologia e hipertrofia nuclear, entretanto diferentemente do selvagem que apresenta formação de poliedro no núcleo da célula, os corpos de inclusão semelhantes a poliedros se restringiram ao citoplasma, com exceção de AP-NS1/DENV1 (Figuras 21-23). A análise eletroforética revelou bandas de 75kDa (NS1 completa fusionada à poliedrina) e 36kDa (AP-NS1 fusionada à poliedrina), confirmadas por *Western Blotting* utilizando, para a incubação, o anticorpo primário anti-hexa-histidina (6xHis) monoclonal de camundongo gerando bandas únicas no tamanho esperado (Figuras 22-23). Entretanto, provavelmente durante a etapa de transformação, o peptídeo AP-NS1-DENV1 não foi corretamente inserido no genoma do baculovírus (AcMNPV) ou o clone formado não foi escolhido para análise e ao invés da expressão da proteína heteróloga, a poliedrina do baculovírus AcMNPV selvagem foi expressa sozinha, dando origem aos poliedros perfeitamente visualizados em microscopia óptica no núcleo celular (Figura 20), gerando a banda de 29kDa visualizada por análise eletroforética (Figura 23-B). Desta maneira o baculovírus recombinante: vAc-AP-NS1/DENV1 foi excluído de análises posteriores.

Uma vez que o trabalho propôs-se a desenvolver uma metodologia eficiente para produção de insumos para detecção da Dengue, diferentes metodologias de purificação foram testadas. Gradiente de sacarose de 40-65% seguindo o protocolo padrão proposto por O’RREILLY, MILLER, LUCKOW, 1993 para purificação de poliedros selvagens, ‘*Ion Exchange Chromatography*’ utilizando o cromatógrafo líquido – FPLC AKTA (Ge Healthcare) e coluna de sepharose ‘*Q-Sepharose SP-XL anion column*’ (GE Healthcare), coluna de níquel ‘*MagneHis™ Ni-Particles*’ (Promega) e gradiente de sacarose 40-80% utilizando protocolo adaptado de ARDISSON-ARAÚJO, 2012. Os quatro primeiros protocolos de purificação não foram bem sucedidos. No gradiente de sacarose de 40-65% a alta densidade dos cristais proteicos formados fez com que a proteína fosse sedimentada para o fundo do tubo atravessando todo o gradiente após ultracentrifugação, não permitindo a separação das outras proteínas de célula de inseto e de baculovírus presentes na amostra.

Por outro lado, para que ocorra a separação por ‘*Ion Exchange Chromatography*’ a proteína deve entrar no gradiente salino formado, no caso gradiente de 0-1M de NaCl, no entanto, o cristal proteico formado era insolúvel e não se ligou na coluna, tentativas de solubilização foram realizadas com carbonato de sódio de 0,3M a 1M, mas também não foi capaz de solubilizar o cristal, que como foi visto no MEV, é altamente rígido, dificultando a solubilização e consequente ligação na coluna de cromatografia. O mesmo problema foi visto durante a purificação por coluna de níquel: ‘*MagneHis™ Ni-Particles*’, as proteínas deveriam se ligar ao níquel presente na coluna através da His-tag (calda de hexa-histidina) presente em todas as construções, mas novamente o problema de solubilidade desfavoreceu a ligação na coluna.

Por fim, um gradiente de sacarose 80-40% foi realizado e conseguiu reter as proteínas após ultracentrifugação na fração formada, em torno de 70-60% de sacarose (Figura 26). A alta concentração da última fração (80%) foi crucial para resolver o problema de densidade extrema dos cristais proteicos formados, no entanto, a purificação não foi total e mesmo com todo o cuidado para evitar degradação, proteínas foram mantidas durante todo o procedimento em baixa temperatura (no gelo) e com adição de inibidor de protease (10µg/mL) em todas as etapas realizadas, pode-se observar rastros referentes à degradação proteica nas amostras purificadas e algumas bandas referentes às proteínas de células de inseto e baculovírus foram observadas (Figura 25).

As proteínas recombinantes: AP-NS1-DENV4 e NS1-DENV1 foram selecionadas para a imunização dos animais, devido à quantidade de cada proteína obtida após purificação, quantidade de ratos disponíveis para o ensaio (apenas quatro) e escolha de amostragens diferentes (peptídeo ou proteína inteira) para posterior análise.

A análise de *Western Blotting* do antissoro produzido revelou o aparecimento de banda na membrana de nitrocelulose dos antígenos produzidos NS1-DENV1 e AP-NS1-DENV4

incubados com os antissoros dos ratos imunizados (1:1.000), comprovando a eficiência da imunização (Figura 29). Pode-se notar diferença entre as bandas obtidas pela incubação dos antissoros respectivos a cada animal, mostrando que a resposta do anticorpo produzido pode sofrer influência do sistema imunológico do animal, como demonstrado por SALVIN; RABIN; NETA, 1990 que observou que a simples mudança de ambiente do animal pode influenciar múltiplos componentes durante a resposta imunológica apresentada.

Após a purificação de anticorpos a partir dos antissoros produzidos contra NS1-DENV1 e AP-NS1-DENV4 e análise por *Western Blotting* incubadas com o anticorpo IgG purificado (1 µg/mL), as proteínas NS1-DENV1 e AP-NS1-DENV4 não mostram sinais positivos, ou seja, não marcaram na membrana, indicando que o título do antissoro não foi suficiente. Portanto, uma nova imunização com aumento da quantidade de antígeno será necessária para aumentar o título do antissoro e possibilitar uma purificação mais eficiente.

O primeiro ensaio realizado para os testes de ELISA indireto foi o teste de sensibilidade ou positividade dos peptídeos sensibilizados isoladamente na placa. O peptídeo AP-NS1-DENV2 obteve 100% (36/36) de sensibilidade nas três placas e trinta e seis amostras analisadas, e os peptídeos AP-NS1-DENV3 e AP-NS1-DENV4 obtiveram 97,2% (35/36) de sensibilidade na mesma amostragem (Figuras 30-32). O segundo ensaio foi realizado com a mistura dos peptídeos AP-NS1-DENV2, AP-NS1-DENV3 e AP-NS1-DENV4. As placas incubadas com DENV-1 obtiveram sensibilidade de 98,4% (64/65), seguido de 98,7% (78/79) para DENV-2, 89,8% (71/79) para DENV-3 e 96,4% (85/86) para DENV-4 (Figuras 33-38 e Tabela 11). Das 309 amostras testadas para todos os sorotipos 298 foram positivas, o método proposto baseado na captura de anticorpos anti-NS1 atingiu, portanto, 96,4% de sensibilidade. Essa taxa é muito alta e corrobora a grande importância do teste apresentado.

A alta sensibilidade de DENV-1 (98,4%), apesar do peptídeo AP-NS1-DENV1 não estar incluído nos testes e conseqüentemente na sensibilização das placas testadas, pode ser atribuída à reatividade imunológica cruzada entre os sorotipos como descrito por RUSSELL et al, 1967 apud TANG; OOI, 2012.

Para termos como base um trabalho que tem como finalidade a detecção de anticorpos pela sensibilização de placas com o antígeno recombinantes, semelhante ao trabalho em questão, pode-se citar o estudo realizado por DOS SANTOS et al, 2004, no qual foram expressos doze peptídeos de diferentes regiões do genoma do DENV-2 (E, NS1, NS3, NS3/4A, NS5) em *E. coli*, no entanto apenas um peptídeo foi escolhido para testes posteriores: o polipeptídeo imunorreativo pD2-3 (baseado na seqüência da proteína E), este foi testado e sua reatividade foi avaliada por IgG-ELISA indireto, obtendo 70% (7/10) de reatividade na fase aguda e 100% (10/10) na fase convalescente, mostrando que a proteína E ou peptídeos derivados da mesma apresentam melhor reatividade na fase tardia da infecção, corroborando

PRINCE; YEH; LAPÉ-NIXON, 2008, enquanto a detecção de NS1 apresenta melhor reatividade na fase inicial demonstrado por BLACKSELL et al, 2011.

HUANG et al, 2001 utilizou a proteína NS1 recombinante de DENV-2 expressa em *E. coli* como antígeno na detecção de anticorpos anti-NS1, IgM e IgG. Das 33 amostras testadas, 15/17 (88%) foram positivas na detecção de anticorpos anti-NS1 em infecção primária e 16/16 (100%) em infecção secundária. O autor discute que anticorpos anti-NS1 eram raramente encontrados em pacientes com infecção primária, enquanto que, em pacientes com infecção secundária eram detectados na maioria dos casos, levando a associação do aparecimento de anticorpos anti-NS1 com a evolução do quadro para DHF, no entanto, os resultados encontrados mostraram que esta relação não ocorre, necessariamente.

LAM et al, 2000 analisou o kit comercial PanBio Dengue Screening ELISA que se propõe a capturar IgM e IgG no mesmo poço, ou seja, durante a mesma análise, através do teste de ELISA direto ou “sanduiche” pela sensibilização da placa com o soro humano contendo anti-IgM e anti-IgG, adição do antígeno de DENV sorotipo 1 a 4 liofilizado e por fim do anticorpo monoclonal anti-flavivirus conjugado com peroxidase. Com estas análises o autor obteve 83,3% de sensibilidade em pacientes com infecção primária (67%, 6/9) e secundária (100%, 9/9) e 94% (32/34) em uma análise geral (com a inclusão de outras amostras).

Os testes propostos por DOS SANTOS et al, 2004; HUANG et al, 2001 e LAM et al, 2000 apresentam, da mesma maneira que o teste proposto no trabalho em questão, a detecção de anticorpos circulantes através da sensibilização do antígeno na placa, apesar de possuírem alvos diferentes (proteína E, NS1 e IgM/IgG, respectivamente) e pequena amostragem, apresentam sensibilidade variando de 67% a 100% e sensibilidade maior em amostras de infecção secundária por DENV. Durante a realização do teste de ELISA indireto não foi feita a separação de amostras contendo infecção primária e secundária, portanto, esta conclusão de variação de detecção entre a amostragem utilizada, não pode ser realizada. Análises posteriores considerando estes fatores serão realizadas.

É importante ressaltar que todas as amostras de DENV-4 incluídas no presente trabalho foram previamente diagnosticadas como negativas pelos testes realizados com os kits Platelia Dengue NS1 AG from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) ou Pan-E Dengue Early ELISA from Panbio (Brisbane, Australia) no LABFLA da Fiocruz, RJ, outro indício da alta sensibilidade do teste proposto, que mesmo com este importante viés, atingiu 96,4% de sensibilidade.

Os testes de especificidade foram realizados com 60 amostras negativas e atingiram 100% de especificidade para todas as placas analisadas (Figura 40), tendo como base o *cut-off* médio das outras placas. Este teste possui um viés negativo, já que não foram adicionadas amostras positivas nas placas testadas para a determinação do *cut-off* específico para cada placa,

como havia sido realizado nos testes anteriores, portanto, novos testes deverão ser repetidos posteriormente para assegurar a confiabilidade do teste.

Nos testes de reatividade cruzada com soro de paciente diagnosticado com Febre Amarela, Rubéola e Sarampo, alguns pontos dos controles negativos de todas as placas testadas ficaram com absorvância elevada e esses dados elevaram o *cut-off* das placas, podendo ter alterado o resultado que não mostrou reatividade cruzada entre as amostras testadas (Figura 41-44). Por falta de amostras, principalmente de Febre Amarela, os testes não puderam ser repetidos, mas posteriormente, com a busca de novas amostras serão repetidos e o número de amostras aumentado, além das doenças analisadas como Leptospirose e Bacteremia como descrito por BLACKSELL et al, 2011.

LIMA et al, 2010 e WANG e SEKARAN ressaltaram a importância da combinação de diagnóstico de detecção de antígeno NS1 e imunocaptura de IgM para o aumento de sensibilidade e tempo de cobertura durante a doença. BLACKSELL et al, 2012; GUZMAN et al, 2010; BLACKSELL et al 2011; HUHTAMO et al, 2009; apresentaram dados que corroboraram esta hipótese, encontraram sensibilidade variando de 82% a 95,9% para os testes combinados e especificidade de 75 a 100% (Tabela 12) seguramente maior que a sensibilidade da detecção somente de NS1 (44,8%-83,6%), no entanto, mesmo a faixa apresentada para o teste combinado é menor do que a faixa de sensibilidade (89,8%-98,7%) e especificidade (100%) do teste proposto no presente trabalho, no entanto, é importante ressaltar que a estratégia utilizada no presente trabalho (detecção de anti-NS1 circulante) é diferente das estratégias empregadas nos trabalhos citados (detecção de antígeno de NS1).

Tabela 12. Tabela comparativa de sensibilidade e especificidade dos testes de detecção de antígeno NS1 e IgM combinados.

Referências	Sensibilidade	Especificidade
Guzman et al, 2010	82%+	100%
Blacksell et al, 2012	87,9%++	84,5-95,6%
Blacksell et al, 2011	89,9-92,9%	75-88%
Huhtamo et al, 2009	95,9%	-

Com base em todos os dados apresentados, o método de detecção proposto apresentou alta sensibilidade e especificidade e não apresentou reação cruzada entre as amostras de Febre Amarela, Sarampo e Rubéola. Demonstrando, assim, ser um protótipo favorável para o desenvolvimento de um novo sistema de diagnóstico no país, com maior sensibilidade e especificidade para as amostras de Dengue analisadas. Podendo, desta maneira, caso implementado, após as devidas validações, atingir uma maior parcela da população, provendo uma diagnose mais eficiente, resultando em um tratamento mais adequado, e auxiliando, desta maneira, a prevenção da Dengue, gerando melhorias e favorecendo a saúde pública no Brasil.

7 PERSPECTIVAS

- Expressão e purificação de AP-NS1-DENV1; NS1-DENV3 e NS1-DENV4.
- Adição de AP-NS1-DENV1 nas placas protótipo do kit de ELISA com a mistura dos peptídeos: AP-NS1-DENV2; AP-NS1-DENV3 e AP-NS1-DENV4.
- Teste de ELISA de NS1-DENV1; NS1-DENV2; NS1-DENV3 e NS1-DENV4.
- Aumento do número de amostras testadas no teste de ELISA, englobando amostras do DF, GO e SP, além de mais amostras do RJ.
- Aumento do número e espécies de amostras testadas para reatividade cruzada (inclusão de amostras de pacientes com outras doenças: Leptospirose, Bacterémia, entre outras).
- Testes de especificidade com a inclusão de controle positivo.
- Construção de uma proteína capaz de detectar IgM, aumentando a sensibilidade do teste e os dias de detecção após o início da doença.
- Análise de sensibilidade de amostras de pacientes, analisando separadamente cada dia após o início da doença.
- Análise de sensibilidade de amostras de pacientes com DF e DHF/DSS, separadamente.
- Análise de sensibilidade de amostras de pacientes com infecção primária e secundária, separadamente.
- Validação e patente nacional do kit de diagnóstico desenvolvido.

8 REFERÊNCIAS

- ALCON, S. et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 376-381, Feb. 2002.
- ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P. **Baculovírus recombinantes expressando toxina inseticida de aranha caranguejeira causam morte celular precoce durante infecção *in vitro***. 2012. 152 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- AVIRUTNAN, P. et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 3, n. 11, p. 183-198, Nov. 2007.
- AVIRUTNAN, P. et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 193, n. 8, p. 1078–1088, Apr. 2006.
- BERNARDO, L. et al. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in non-human primates. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 194-199, Nov. 2008.
- BHAMARAPRAVATI, N.; SUTEE Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v. 18, n. 2, p. 44–47, May 2000.
- BLACKSELL, S. D.; JARMAN, R. G.; BAILEY, M. S. Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: the need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. **Clinical Vaccine Immunology**, Washington, v. 18, n. 12, p. 2095–2101, 2011.
- CASTRO, M. E. B. et al. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 10, out. 1999.
- CHUA, K. B.; MUSTAFA, B.; ABDUL, W. A. H. A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single-acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. **Malaysian Journal of Pathology**, Kuala Lumpur, v. 33, n. 1, p. 13–20, 2011.
- CUZZUBBO, A. J. et al. Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus infection in an immunochromatographic assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, Queensland, v.8, n.6, p.1150-1155, Nov. 2001
- DOS SANTOS, et al. Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, California, v.71, n.2, p.144-152. 2004.
- ERAM, S. et al. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. II. Clinical studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 28, n. 4, p. 711-716, July 1979.
- FARRAR, et al. Towards a global dengue research agenda. **Tropical Medicine Institute of Health**, v.12, p.695-701, 2007.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus do Dengue. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 15-20, 1999.

FRAIHA, H. Reinfestação do Brasil pelo *Aedes aegypti*: considerações sobre o risco de urbanização do vírus da febre amarela silvestre na região reinfestada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 10, n. 5, p. 289-294, 1968.

GRANADOS, R. R., et al. A new insect cell line form *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 64, p. 260-266. 1994.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 480-496, July 1998.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. **Emerging Themes in Epidemiology**, London, v. 2, p. 1, 2005.

GUZMÁN, M.G., KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p.33-42, Jan. 2002.

HEINZ, F.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v. 30, n. 29, p. 4301-4306, June 2012.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viroses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, n. 4, p. 376, 1990.

HITCHMAN, R. B. et al. Baculovirus as vectors for human cells and applications in organ transplantation. **Journal of Invertebrate Pathology**, NewYork, v. 107, p. 49-58, July 2011.

HO, L. J. et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, n. 3, p. 1499-1506, Feb. 2001.

HUANG et al, High-Level Expression of Recombinant Dengue Viral NS-1 Protein and Its Potential Use as a Diagnostic Antigen, **Journal of Medical Virology**, v.65, p.553-560, 2001.

INCEOGLU, A. B. et al. Recombinant baculoviruses for insect control. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 57, n. 10, p. 981-987, Oct. 2001.

JARMAN, R. G.; NISALAK, A.; ANDERSON, K. B. Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 84, n. 2, p. 218-223, 2011.

JENNINGS, G. T.; BACHMANN, M. F. The coming of age of virus-like particle vaccines. **Biological Chemistry**, Berlin, n. 389, p. 521-536, 2008.

KORAKA, P. et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p.4154-4159, 2003.

KORAKA, P. **Dengue Virus Specific Immune Response: Implications for laboratory diagnosis and vaccine development**. 2007. 174 f. Thesis (Doctor) - Erasmus University Rotterdam, Netherland, 2007.

KORAKA, P.; MARTINA, B. E. E.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Bioinformatics in New Generation Flavivirus Vaccines. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 864029, 2010.

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

KROEGER, A.; NATHAN, M. B. Dengue: setting the global research agenda. **Lancet**, Geneva, v.368, p. 2193–2195, Dec. 2006

KUBERSKI, T. T.; ROSEN, L. Identification of dengue viruses using complement fixing antigen produced in mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 26, n. 3, p. 538–543, 1977. In: TANG, K. F.; OOI, E. E. Diagnosis of dengue: an update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 10, n. 8, p. 895–907, 2012.

KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, n. 10, p.776–788, Oct. 2008.

LAM et al, Evaluation of a capture screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Combined Determination of Immunoglobulin M and G antibodies produced during Dengue Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n.5, p.850-852, Sept. 2000.

LEI, H. Y. et al. Immunopathogenesis of dengue virus infection. **Journal of Biomedical Science**, Basel, v. 8, n. 5, p. 377-388, Sept. 2001.

LEPARC-GOFFART, I.; BARAGATTI, M.; TEMMAM, S. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 61–66, 2009.

LEROUX-ROELS, G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. **Vaccine**, Kidlington, v. 23, p. 25-36, Aug. 2010.

LIBRATY, D. H.; YOUNG, P. R.; PICKERING, D. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 8, p. 1165–1168, 2002.

LIMA, M. R. et al. A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 5, May 2011.

LIN, S. W. et al. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. **Journal of Infection**, London, v. 64, n. 3, p. 325-334, Mar. 2012.

MAIRIANG, D. et al. Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 1, 2013.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 22, n. 4, p. 564, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Brasília, DF: SVS, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue, diagnóstico e manejo clínico, adulto e criança. Brasília, DF: SVS, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico, SVS, 2012.

MULLER, D. M.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 13, p. S0166-3542, Mar. 2013.

NOISAKRAN, S. et al. Cells in dengue virus infection in vivo. **Advances in Virology**, Bethesda, v. 2010, p. 164878, 2010.

PATEY, O. et al. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, n. 6, p. 793-802, June 1993.

PAUDEL et al. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. **North American Journal of Medical Sciences**, Bangkok, v.3, n.10, p.478-485, Oct, 2011.

PAWITAN, J. A. Dengue virus infection: predictors for severe dengue. **Acta Medica Indonesiana**, Jakarta, v. 43, n. 2, p.129-135, Apr. 2011.

PEELING, R. W. Evaluation of diagnostic tests: Dengue. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. S30–S37, 2010.

PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.

PORTAL da saúde. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional>> Acesso em: abr. 2013.

PRINCE, H. E.; YEH, C.; LAPÉ-NIXON, M. Development of a more efficient algorithm for identifying false-positive reactivity results in a dengue virus immunoglobulin M screening assay. **Clinical Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, n. 8, p. 1304–1306, 2008.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A. Treatment of dengue fever. **Infection and drug resistance**, Sri Lanka, v.5, p.103-112, Jun. 2012.

RAVIPRAKASH, K. et al. A tetravalent dengue vaccine based on a complex adenovirus vector provides significant protection in rhesus monkeys against all four serotypes of dengue virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 14, p. 6927-6934, May 2008.

RICE, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, v. 229, p. 726-733, 1985. In: HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viroses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, n. 4, p. 376, 1990.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus molecular biology**. 2nd ed. Bethesda: National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, 2011.

RUSSELL, P. K. et al. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *Journal of Immunology*, v. 99, n. 2, p. 285–290, 1967. In: TANG, K. F.; OOI, E. E. Diagnosis of dengue: an update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 10, n. 8, p. 895–907, 2012.

SABCHAREON, A. P. et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **Lancet**, London, v. 3, p. 1559-1567, Nov. 2012.

SABIN, A. B. Dengue. p. 361-373, 1959. In: HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viroses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, n. 4, p. 376, 1990.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

SCHMITZ, J. et al. Next generation dengue vaccines: a review of candidates in preclinical development. **Vaccine**, Kidlington, v. 29, n. 42, p. 7276-7284, Sept. 2011.

SILER, J. F.; HAAL, M. W.; HITCHENS, A. P. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philipp. Journal Science*, v. 29, p. 1-304, 1926. In: HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viroses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, n. 4, p. 376, 1990.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular Cell Biology**, v.3, p.2156-2165, 1983.

TANG, K. F.; OOI, E. E. Diagnosis of dengue: an update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 10, n. 8, p. 895–907, 2012.

UNGER, T.; PELEG, Y. Recombinant protein expression in the baculovirus-infected insect cell system. **Methods in Molecular Biology, Rehovot**, v. 800, p.187-286. 2012.

VAUGHN, J. L., et al. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **In vitro**, v.13, p. 213-217. 1977.

VIRAL Zone. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/537.html> Acesso em: abr. 2013.

VERMA, R.; BOLETI, E.; GEORGE, A.J.T. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. **Journal of Immunological Methods**, London, v.216, p.165-181, 1998.

WANG, S. M.; SEKARAN, S. D. Evaluation of a Commercial SD Dengue Virus NS1 Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Early Diagnosis of Dengue Virus Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 8, p. 2793-2979, Aug. 2010.

WANG, X. H. et al. Discovery and structure of a potent and highly specific blocker of insect calcium channels. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 43, p. 40306-40312, Aug. 2001.

WESTAWAY, E. G. et al. Flaviviridae. *Intervirology*, v. 24, p. 183-192, 1985. In: HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viroses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, n. 4, p. 376, 1990.

WHO. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. New Edition. Geneva: WHO, 2009.

WHO. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. Second Edition. Geneva: WHO, 1997.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C. P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, Kidlington, v. 29, p. 7221–7228, 2011.

YOUNG, P. R. et al. An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 1053-1057, Mar. 2000.

YOTO, Y. et al. Serological diagnosis for human parvovirus B19 infection by an enzyme immunoassay kit with recombinant antigens synthesized in a baculovirus expression system. *Kansenshogaku Zasshi*, Sapporo, v. 69, n. 10, p. 1135-1140, Oct. 1995. In: ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P. **Baculovirus recombinantes expressando toxina inseticida de aranha caranguejeira causam morte celular precoce durante infecção *in vitro***. 2012. 152 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

YU-CHEN, HU. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shanghai, v. 26, n. 4, p. 405–416, Apr. 2005.

ZHENG, Z. et al. Highly Efficient and Economical Baculovirus Expression System for Preparing Human Papillomavirus Type16 Virus-like Particle. **Acta Biochimica and Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 36, n. 8, p. 548-552, Aug. 2004.