

Mariana Maraschin da Rocha

**PRESENÇA DE ANTICORPOS CONTRA UM PEPTÍDEO
CONSERVADO DO ENVELOPE DO DENGUE VÍRUS EM
SORO HUMANO**

Dissertação de Mestrado submetido(a)
ao Programa de Biotecnologia e
Biociências da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Biotecnologia e
Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Santos
Mansur

Florianópolis
2016

*Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.*

Rocha, Mariana Maraschin da
PRESENÇA DE ANTICORPOS CONTRA UM PEPTÍDEO CONSERVADO DO
ENVELOPE DO DENGUE VIRUS EM SORO HUMANO / Mariana
Maraschin da Rocha ; orientador, Daniel Santos Mansur -
Florianópolis, SC, 2016.
90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biotecnologia e
Biociências. 3. Proteína E. 4. Peptídeo E250-270. I. Mansur,
Daniel Santos. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.
III. Título.

"Presença de anticorpos contra um peptídeo conservado do envelope do Dengue vírus em soro humano"

Por

Mariana Maraschin de Rocha

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (C7/PPGBT/2010) do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Indústria - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Maria Steindel

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Bio-Indústrias

Banca examinadora:



Dr(a) Emanuel Santos Mansur (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Juliana Bordignon (Fundação Oswaldo Cruz)



Dr(a) Carlos Roberto Zarotti (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Patrícia Hermes Stocco (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2010.

Este trabalho é dedicado a minha família, principalmente a minha mãe Luiza, meu marido Rafael, minha irmã Tatiana e meu cunhado Araby pelo apoio incondicional em todas as etapas deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Daniel Mansur, pelo desafio proposto durante dois anos e meio de mestrado, por me ensinar a ser mais curiosa e ver a vida de uma forma diferente. Ao professor André Báfica, que me ensinou a duvidar, questionar, criticar e observar. Todos esses anos ao lado de vocês foram de muito aprendizado.

Agradeço com muito amor e carinho ao meu cunhado Araby Nácul, pelo amor, dedicação, apoio e abdicação de seu tempo, muitas vezes com a família, para me ajudar nos principais momentos durante o mestrado. Mais uma vez eu relembro a frase, que no início dessa etapa eu lhe disse: “Fizeste muito mais por mim, do que meu pai durante a vida inteira”. Te amo.

Ao meu amor Rafael Barbizan, meu companheiro de todas as horas, marido dedicado, amoroso e amigo, que secou minhas lágrimas em momentos de desespero, me motivou quando eu não acreditava em mim mesma e me fez sorrir! Te amo. Esses dois anos e meio não seriam os mesmos sem você ao meu lado, Obrigada!

Agradeço a minha mãe Luiza, por todo o seu amor, carinho e dedicação. A minha irmã Tatiana, pelo apoio e amor incondicional. Agradeço com o maior amor do mundo aos meus sobrinhos Vincenzo, Valentina e Lorenzo, por tornar a minha vida mais doce.

Obrigada Adara, minha “co-orientadora” de mestrado! Mami!! Tenho certeza que ganhei uma amiga para a vida toda. Muito obrigada por me ajudar durante esses mais de dois anos...pelas conversas, por salvar meus experimentos quando eu achava que não tinha salvação!! Obrigada por acreditar em mim.

Um muito obrigada a família Lidiana! Paula, que me ensinou muitas das técnicas que eu desenvolvi durante o mestrado, pelos conselhos....pão de queijo e doce de leite de Minas, uaiii! Nú! Agradeço de coração a Puka, Cris, Filho, Renata, Murilo, Carol, Daniel Mendes, Flávia, Anaclara, Jéssica, Rafael, Lívia, Lucas e Constanza, vocês são incríveis!

Aos professores Mário Steindel, Edmundo Carlos Grisard, Patrícia Stoco, Oscar Bruna Romero, Carlos Zanetti, Juliano Bordignon, Rafael Rosa e Marcelo Farina por terem contribuído com seus conhecimentos e alguns com reagentes e espaços de seus laboratórios durante a realização desse trabalho. Aprendi muito com todos vocês!

Agradeço as meninas da protozoologia, Ana, Carime, Greice, Aninha, Laís e Milene.

Às agências de fomento CAPES e Cnpq pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

A vida é uma grande pergunta em busca de
grandes respostas.
(Augusto Cury)

RESUMO

A dengue é considerada um grande problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais do mundo. O principal alvo de anticorpos para o vírus da dengue (DENV) é a proteína do envelope (E). Áreas da proteína E que são conservadas estruturalmente e funcionalmente podem ser alvos de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos. Dados de bioinformática da proteína E do DENV identificaram a presença de um peptídeo altamente conservado na estrutura de todos os quatro sorotipos virais, localizado no E-DII da proteína viral. O peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀ constitui a maior porção conservada e é exposto na conformação trimérica da proteína E. Acredita-se que anticorpos direcionados contra ele possam ser neutralizantes. O presente trabalho avaliou a presença de anticorpos anti-E₂₅₀₋₂₇₀ em soro de pacientes infectados. Para tanto, um ELISA indireto contra E₂₅₀₋₂₇₀ foi desenvolvido. Inicialmente foram expressas as proteínas GST e KLH fusionadas ao peptídeo e ambas foram utilizadas como antígenos de imunização para obtenção de anticorpo monoclonal contra o E₂₅₀₋₂₇₀. Para o ELISA indireto, foram selecionadas 82 amostras, 54 positivas para dengue (DV) e 28 de doadores saudáveis. A área sob a curva (ASC) foi calculada para cada amostra através de uma leitura cinética de 30 minutos (DO 450 nm) e a curva ROC foi construída visando o critério de máxima sensibilidade e especificidade. Os grupos testados diferiram entre si em relação à média da ASC ($t = -2,9722$, $df = 80$, $p = 0,0039$). O ponto de corte sugerido pela curva ROC foi de 10,386, com sensibilidade de 59,2 % e especificidade de 64 %, VPP = 74,4 % e VPN = 45,0 %. Entre as amostras positivas para DV, 34 delas ficaram acima do ponto de corte, indicando a presença de anticorpos IgG anti-E₂₅₀₋₂₇₀. Entre os doadores saudáveis, 10 amostras ficaram acima do ponto de corte, entretanto foi verificado que sete delas haviam sido vacinadas contra a febre amarela, que também é um *Flavivirus*. Isso pode explicar o reconhecimento de E₂₅₀₋₂₇₀, uma vez que existem similaridades entre as sequências do peptídeo com a sequência do vírus atenuado da vacina. Dessa forma, o estudo demonstrou a presença de anticorpos contra E₂₅₀₋₂₇₀ em amostras positivas para DV. Estudos futuros poderão correlacionar a presença desses anticorpos com gravidade ou proteção da doença.

Palavras-chave: *Dengue vírus*; proteína E; peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀; anticorpos neutralizantes.

ABSTRACT

Dengue represents a large-scale public health problem in tropical and subtropical regions of the world. The main target of antibodies against dengue virus (DENV) is the envelope protein (E). Structurally and functionally preserved regions of the E protein can be target of neutralizing antibodies against all four serotypes. Bioinformatics data on the E protein of DENV identified the presence of a highly conserved peptide in all four serotypes' structure located on the E-DII of the viral protein. E₂₅₀₋₂₇₀ peptide is the most conserved portion of the E protein and is exposed in its trimeric conformation. It is thought that antibodies directed against it might be neutralizing. Therefore, this study evaluated the presence of anti-E₂₅₀₋₂₇₀ antibodies in serum of infected patients through an indirect ELISA. E₂₅₀₋₂₇₀ fused to GST and KLH proteins were expressed and used as immunizing antigens to obtain monoclonal antibodies against E₂₅₀₋₂₇₀. For indirect ELISA, we selected 82 samples, 54 positive for dengue (DV) and 28 healthy donors. The area under the curve (AUC) was calculated for each sample from kinetic readings up to 30 minutes (OD 450 nm) and a ROC curve was built using maximum sensitivity and specificity criteria. Tested groups differed among each other in comparison to AUC mean ($t = - 2.9722$, $df = 80$, $p = 0.0039$). The suggested cut-off point for the ROC curve was 10.386, with a sensitivity of 59.2 % and specificity of 64 %, PPV = 74.4 % and NPV = 45.0 %. Among positive samples for DV, 34 of them were above the cut-off point, indicating the presence of IgG antibodies anti- E₂₅₀₋₂₇₀. Among healthy donors, 10 samples were above the cut-off; however, seven of them had been vaccinated against yellow fever, which is also caused by a *Flavivirus* and has a similar peptide sequence. Thus, the study showed the presence of antibodies against E₂₅₀₋₂₇₀ in positive samples for DV. Future studies could correlate the presence of these antibodies with gravity or protection against the disease.

Key - Words: *Dengue virus*; E protein; E₂₅₀₋₂₇₀ peptide; neutralizing antibodies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de replicação do vírus da dengue.....	30
Figura 2 – Mecanismo de neutralização e ADE	36
Figura 3 – Estrutura tridimensional da glicoproteína E do vírus da dengue	37
Figura 4 – Regiões conservadas da glicoproteína E.....	37
Figura 5 – Perfil de conservação nos aminoácidos nos DENV	38
Figura 6 - Análise de fragmento E ₂₅₀₋₂₇₀ em vetor pET41a	57
Figura 7 - Frações obtidas da expressão da proteína GST_E ₂₅₀₋₂₇₀ em bactéria <i>E. coli</i> BL21DE3 transformadas com plasmídeo de expressão pET41a	58
Figura 8 - Purificação da GST_E ₂₅₀₋₂₇₀ por coluna de afinidade de níquel em FPLC	59
Figura 9 - SDS-PAGE corado com nitrato de prata apresentando a fração obtida após a purificação da proteína GST_E ₂₅₀₋₂₇₀ em coluna de níquel	60
Figura 10 - Purificação da GST_E ₂₅₀₋₂₇₀ em coluna de afinidade por GST em FPLC.....	61
Figura 11 - Purificação da GST_E ₂₅₀₋₂₇₀ em coluna de afinidade por GST.....	62
Figura 12 - Frações obtidas da expressão da proteína GST_E ₂₅₀₋₂₇₀ em bactéria <i>E. coli</i> BL21 <i>códon plus</i> transformadas com plasmídeo de expressão pET41a.....	63
Figura 13 - Purificação da GST_E ₂₅₀₋₂₇₀ por coluna de afinidade de Níquel em FPLC.....	64
Figura 14 - Purificação da GST_ E ₂₅₀₋₂₇₀ em coluna de afinidade por GST.....	65
Figura 15 - Presença de anticorpos contra proteína GST_E ₂₅₀₋₂₇₀ gerados após ensaio de imunização.....	67
Figura 16 - Presença de anticorpos contra proteína KLH_E ₂₅₃₋₂₇₀ gerados após ensaio de imunização.....	68
Figura 17 - Ensaio da atividade neutralizante do soro de animais imunizados contra KLH_ E ₂₅₃₋₂₇₀ e GST_ E ₂₅₀₋₂₇₀	69
Figura 18 - Ensaio da atividade neutralizante do sobrenadante do hibridoma 966 produzido através da imunização de animais contra KLH_ E ₂₅₃₋₂₇₀ e GST_ E ₂₅₀₋₂₇₀	70
Figura 19 - ELISA indireto dos sobrenadantes dos hibridomas testados contra E ₂₅₃₋₂₇₀	71

Figura 20 - Comparação da ASC (área sob a curva) dos doadores saudáveis (n = 28) e positivos para DV (n = 54) testados para o peptídeo E ₂₅₀₋₂₇₀	72
Figura 21 - Curva ROC com critério de máxima sensibilidade e especificidade baseado em ensaio de ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG contra E ₂₅₀₋₂₇₀	73
Figura 22 - Presença de anticorpos IgG anti - E ₂₅₀₋₂₇₀ em amostras de soro coletadas da população.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Método de purificação por cromatografia de afinidade à histidina em coluna Histrap FF de 1 mL	43
Quadro 2 – Método de purificação por cromatografia de afinidade à GST em coluna <i>Glutathione Affinity Cartridges</i> de 5 mL.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores para cada sorotipo da dengue 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADE - *Antibody Dependent Enhancement*
ASC – Área sob a curva
BSA – albumina sérica bovina (do inglês *Bovine serum albumin*)
C – Proteína do capsídeo
CMC – Carboximetilcelulose
CO₂ – Dióxido de carbono
DENV – *Dengue virus*
DMEM/F12 – *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)
DTT – Ditioneitol
E – Proteína do envelope
E-DI – Domínio I da proteína do envelope
E-DII – Domínio II da proteína do envelope
E-DIII – Domínio III da proteína do envelope
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – *Linked Immunosorbant assay*
FcR – Receptor Fc
FD – Febre da dengue
FHD – Febre hemorrágica da dengue
FI – Fração insolúvel
FNP – Fração não purificada
FPF – Fração purificada filtrada
FPLC – cromatografia líquida de proteína rápida (do inglês *Fast protein liquid chromatography*)
FS – Fração solúvel
FS – Fração solúvel
FT – *Flow through*
GSH – L-glutationa
GST – Glutationa – S – transferase
HRP - *Horseradish peroxidase*
IFI – Imunofluorescência indireta
IFN – Interferon
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL – Interleucina
IPTG - isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
IS-I – Fração insolúvel induzida por IPTG
IS-NI – Fração insolúvel não induzida por IPTG

Kb – Quilobases
kDa – Quilodáltons
KLH - *Keyhole limpet hemocyanin*
L – Litros
LB – Lúria-Bertani
M – Molar
M – Proteína de membrana
mA – miliampéres
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex*)
mL – mililitros
mM – minimolar
mRNA – RNA mensageiro
ng – nanogramas
nm – Nanômetros
DO – Densidade ótica
OPD – O-fenilenediamine
pb – Pares de base
PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)
PM – peso molecular
prM – Proteína precursora de membrana
PRNT - Teste de neutralização por redução de placa (do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*)
RE – Retículo endoplasmático
RER – Retículo endoplasmático rugoso
RNA – Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)
ROC - *Receiver Operator Characteristics*
rpm – Rotação por minuto
SCD – Síndrome do choque da dengue
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SFB – Soro fetal bovino
S-I – Fração solúvel induzida por IPTG
SND – Sobrenadante de hibridoma
S-NI – Fração solúvel não induzida por IPTG
TNF – Fator de necose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*)

SUMÁRIO

1 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	27
1.1 DENGUE: CONSIDERAÇÕES GERAIS E EPIDEMIOLOGIA ...	27
1.2 BIOLOGIA DO VÍRUS DA DENGUE.....	28
1.3 TRANSMISSÃO.....	30
1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	31
1.5 IMUNOPATOLOGIA.....	32
1.5.1 Resposta imune mediada por células, citocinas e sistemacomplemento	32
1.5.2 Resposta imune mediada por anticorpos.....	34
1.6 GLICOPROTEÍNA E.....	36
2 OBJETIVOS.....	39
2.1 OBJETIVO GERAL.....	39
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE	41
3.1.1 Clonagem e transformação de proteína recombinante GST_ E₂₅₀₋₂₇₀	41
3.1.2 Proteína recombinante KLH_ E₂₅₃₋₂₇₀	42
3.1.3 Expressão de proteína quimérica GST_ E₂₅₀₋₂₇₀	42
3.1.4 Purificação da GST_ E₂₅₀₋₂₇₀ por cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) em coluna de níquel	43
3.1.5 Purificação da GST_ E₂₅₀₋₂₇₀ por cromatografia líquida de proteína (FPLC) em coluna de Glutaciona – S – transferase.....	44
3.2 WESTERN BLOT.....	45
3.3 COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA.....	45
3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD	46
3.5 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS	46
3.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA E ₂₅₀₋₂₇₀	47
3.6.1 Células de Mieloma.	47
3.6.2 Esplenócitos.....	47
3.6.3 Fusão.....	48
3.6.4 Triagem dos clones	48
3.7 CÉLULAS Huh7.5	49
3.8 TITULAÇÃO VIRAL ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE PLACAS DE LISE.....	50

3.9	TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACA (<i>PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST – PRNT</i>)	50
3.10	ELISA INDIRETO CONTRA E ₂₅₃₋₂₇₀	51
3.11	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES E DOS DADOS CLÍNICOS	52
3.11.1	Pacientes.....	52
3.11.2	Critério de inclusão e exclusão.....	53
3.11.3	Coleta da amostra	53
3.11.4	Testes laboratoriais realizados para confirmação de Dengue.....	53
3.11.5	Delineamento experimental.....	54
3.12	ANÁLISE DE DADOS.....	54
4	RESULTADOS.....	57
4.1	CLONAGEM DO GENE QUE EXPRESSA A PROTEÍNA QUIMÉRICA GST_ E ₂₅₀₋₂₇₀	57
4.2	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GST_ E ₂₅₀₋₂₇₀ EM CEPA <i>E. coli</i> BL21 CÁLCIO COMPETENTE	58
4.3	PURIFICAÇÃO DA GST_ E ₂₅₀₋₂₇₀ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS EM COLUNA DE NÍQUEL ...	59
4.4	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO C4/C5 POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNA EM COLUNA DE AFINIDADE GST	60
4.5	NOVA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GST_ E ₂₅₀₋₂₇₀	62
4.6	PURIFICAÇÃO DA GST_ E ₂₅₀₋₂₇₀ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS EM COLUNA DE NÍQUEL ...	63
4.7	ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA E ₂₅₀₋₂₇₀	66
4.8	DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS GST_ E ₂₅₀₋₂₇₀ E KLH_ E ₂₅₃₋₂₇₀ ATRAVÉS DO SORO DE ANIMAIS IMUNIZADOS	66
4.9	FUSÃO E TRIAGEM DOS CLONES.....	68
4.10	SORONEUTRALIZAÇÃO PRNT (<i>PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST – PRNT</i>) DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI - E ₂₅₀₋₂₇₀ EM SORO HUMANO POR ELISA INDIRETO.....	69
4.11	DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI – E ₂₅₃₋₂₇₀ EM SORO HUMANO POR ELISA INDIRETO.....	71
4.12	DADOS AVALIADOS UTILIZANDO O CÁLCULO DA ASC (ÁREA SOB A CURVA).....	73
4.13	DADOS COMPARATIVOS ENTRE AMOSTRAS DE DOADORES SAUDÁVEIS E POSITIVOS PARA DENGUE ATRAVÉS DE ELISA INDIRETO CONTRA E ₂₅₃₋₂₇₀	74
5	DISCUSSÃO.....	75

6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXO A.....	89

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 DENGUE: CONSIDERAÇÕES GERAIS E EPIDEMIOLOGIA

A dengue é uma infecção viral sistêmica, autolimitada, transmitida por mosquitos com a mais rápida taxa de propagação na atualidade. Sua incidência aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos, estando presente em mais de 125 países, sendo responsável por uma epidemia que acomete 390 milhões de pessoas por ano, estando um terço da população mundial em risco (SIMMONS et al., 2012; WHO, 2009; BHATT, 2013).

Sua origem e evolução ainda permanecem incertas, alguns autores sugerem que na Ásia, iniciou-se um ciclo silvestre entre primatas não – humanos e mosquitos do gênero *Aedes*. Outros autores propõem que sua origem se deu na África e que sua dispersão para outras regiões do mundo, ocorreu através dos navios negreiros, juntamente com seu principal vetor (GUBLER, 1997; WANG, 2000; HOLMES, 2002).

O primeiro relato de epidemia considerando a possibilidade de ser dengue ocorreu em 1779 e 1780 em três continentes: Ásia, África e América. Outras epidemias ocorreram com intervalos irregulares (GUBLER, 1997).

O primeiro vírus, *Dengue virus 1* (DENV-1), foi descoberto no final da segunda Guerra Mundial na Polinésia Francesa e no Japão em 1943. O *Dengue virus 2* (DENV-2) foi citado pela primeira vez na Papua-Nova Guiné e Indonésia em 1944, e *Dengue virus 3* (DENV-3) e *dengue virus 4* (DENV-4) aparecem juntos em 1953 nas Filipinas e Tailândia (MESSINA; HAY, 2014).

A dispersão do vírus e do mosquito *Aedes aegypti* durante a segunda Guerra Mundial, através das movimentações de soldados, juntamente com a destruição do meio ambiente e os assentamentos humanos, criaram condições que iniciaram uma pandemia de dengue no século 20 (GUBLER, 2014).

O crescimento populacional não controlado e planejado, a falta de acesso à água potável, assim como falhas nas políticas nacionais no controle do vetor, a modernidade dos transportes e demais fatores, contribuíram para a dispersão da dengue, sendo que nos últimos 70 anos, a doença mostra prevalência em regiões tropicais e subtropicais do planeta. (KYLE; HARRIS, 2008; MESSINA; HAY, 2014).

Estudos apontaram uma incidência global de 294 milhões de casos assintomáticos de dengue em 2010 (BHATT, 2013). Este estudo

também reportou a incidência global de 96 milhões de casos sintomáticos de dengue, os quais estariam distribuídos principalmente na Ásia com 70% dos casos (34% somente na Índia), África com 16% e Américas com 14% (sendo mais da metade no Brasil e México). Esses dados demonstraram que a incidência global anual de casos sintomáticos e assintomáticos de dengue é de aproximadamente 390 milhões, ou seja, três vezes mais do que o divulgado pela WHO em 2009 (BHATT, 2013).

Entre os anos de 2001 e 2007, foram notificados 4.332.731 casos de dengue nas Américas, sendo 64,6 % em países do Cone Sul (WHO, 2009). Os números oficiais, em 2015, até a semana epidemiológica 46 foram de 2.138.415 casos para as Américas, sendo 1.580.584 casos em países do Cone Sul com uma taxa de incidência de 351,9 por 100.000 habitantes (PAHO, 2015).

No Brasil, entre os anos de 2001 até 2012 foram registrados 5.734.166 casos de dengue (BRASIL, 2015a). Em 2013 foram notificados 1.452.489 casos em todo o país. O maior número de notificações ocorreu na região Sudeste com 63,21 %. Minas Gerais registrou 416.252 casos, seguido por São Paulo com 220.921 casos e Rio de Janeiro com 213.058 casos. Na região Centro Oeste registraram-se 18,23 %, e região Nordeste 10,48 % (BRASIL, 2015b). Em 2014 foram notificados 589.107 casos no Brasil, destes 752 casos de dengue grave (BRASIL, 2015b).

O Boletim epidemiológico (2015), até a semana 48, registrou 1.587.080 casos prováveis de dengue, com 1.529 casos de dengue grave, sendo confirmados 839 óbitos, o que representa um aumento de 80,4% em comparação ao período de 2014, quando foram confirmados 465 óbitos.

De acordo com a Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina, em 2015, foram notificados 10.912 prováveis casos de dengue no Estado. Destes, 3.596 foram confirmados, 6.332 foram descartados e 984 casos estão em investigação. Do total de casos confirmados, 91% são autóctones, 7% importados e 2% estão sendo investigados (SANTA CATARINA, 2015).

1.2 VÍRUS DA DENGUE

O vírus da dengue é um arbovírus, membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. São pequenas partículas esféricas de aproximadamente 40-50 nanômetros (nm) de diâmetro, e apresentam-se em quatro sorotipos DENV-1 – DENV-4. Possui genoma RNA senso

positivo de fita simples, de aproximadamente 11 Kb (FIELDS, 2013; ROTHMAN, 2011; 2010). Seu genoma codifica uma única poliproteína que apresenta três proteínas estruturais (C, capsídeo; pr/M, membrana; E, envelope) e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (GREEN et al., 2013).

Os DENV interagem com células do sistema imune de linhagem mielóide, e apresentam tropismo, com monócitos, macrófagos e células dendríticas (ROTHMAN, 2011; GREEN et al., 2013). Seu processo de replicação viral inicia quando o vírus se liga aos receptores de superfície celular e é internalizado através da formação de vesículas endocíticas recobertas por clatrina (GREEN et al., 2013). A acidificação do endossoma proporciona uma mudança na conformação estrutural da proteína E (envelope), possibilitando a fusão da membrana viral com a membrana da vesícula endocítica. Esse poro de fusão permite que o nucleocapsídeo seja liberado e o RNA viral desnudado, sendo liberado no citoplasma, apresentando-se para o RER (retículo endoplasmático rugoso). No RER, o mRNA é traduzido em uma única poliproteína, que posteriormente é clivada por proteases virais e do hospedeiro (FIELDS, 2013; SCREATON et al., 2015, MUKHOPADHYAY et al., 2005). Um complexo de replicação é formado e novas fitas positivas são sintetizadas, as quais serão empacotadas na proteína do capsídeo, formando o nucleocapsídeo (SCREATON et al., 2015, MUKHOPADHYAY et al., 2005). A montagem do vírus ocorre na superfície do RE (retículo endoplasmático) e partículas não infecciosas e imaturas são produzidas. O material é então liberado para o complexo de Golgi onde ocorre a clivagem de pr/M em M pela protease *Furin*, o que resulta em um rearranjo de M e E na superfície do vírus. A partícula madura pode então ser liberada da célula. (WHITEHEAD, 2007; FIELDS, 2013; SCREATON et al., 2015). O ciclo viral pode ser observado na Figura 1.

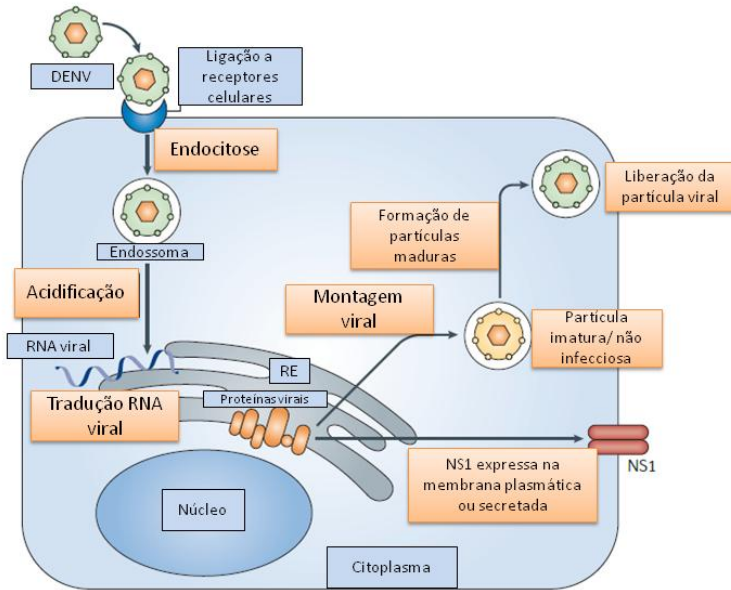


Figura 1. Ciclo de replicação do vírus da dengue. Partículas virais ligam-se a receptores de superfície celular e são internalizados por endocitose. A acidificação do endossoma confere um rearranjo estrutural da proteína E, a qual funde-se com a membrana endossomal e libera o RNA genômico no citoplasma. No retículo endoplasmático, o RNA viral é traduzido em uma poliproteína a qual é clivada e um complexo de síntese de RNA é formado dando origem a novas fitas. Em seguida, novas partículas virais são formadas e liberadas para o complexo de golgi, onde a proteína prM é clivada em M, dando origem a partículas maduras.

Adaptado de: Alan L. Rothman, 2011.

1.3 TRANSMISSÃO

O *A. aegypti* é um pequeno mosquito, de cores preta e branca e que prefere depositar seus ovos em recipientes artificiais com água parada acumulada em vasos de plantas, pneus, cisternas, contêiner de água, tanques, entre outros (GUBLER, 1998). Este artrópode é considerado um eficiente vetor, uma vez que é antropofílico, realiza várias picadas para sua alimentação e está bem adaptado para viver próximo aos seres humanos (WHO, 2009).

O ciclo de transmissão ocorre durante a fase de viremia da doença no hospedeiro vertebrado, quando o mosquito fêmea pode ser infectado

ao realizar o repasto sanguíneo. Partículas virais são ingeridas e infectam primeiramente as células epiteliais do intestino médio do vetor onde ocorre a replicação viral e posterior liberação de novas partículas infecciosas para a hemocele. Essas partículas infectam outros tecidos e chegam até as glândulas salivares onde podem ser transmitidas para outros indivíduos durante sua alimentação (GUBLER, 1998; WHO, 2009; BLACK et al., 2002).

Após a picada do mosquito infectado, o vírus permanece incubado no indivíduo por um período de 3 a 14 dias (média de 4 a 7 dias). Após o período de incubação intrínseca ocorre o período de viremia, que pode levar de 2 a 10 dias e é regularmente acompanhado de sintomas como febre, calafrios e mal-estar. Durante este período, o vírus circula pelo sangue periférico do hospedeiro humano, o qual pode infectar o mosquito quando este realizar o repasto sanguíneo (GUBLER, 1998; ROTHMAN, 2011; CARRINGTON; SIMMONS, 2014). As partículas ingeridas pelo mosquito permanecem em um período extrínseco de incubação de 8 a 12 dias, após, este pode infectar outros indivíduos, caracterizando o ciclo *A. aegypti* – humano – *A. aegypti* (WHO, 2009; GUBLER, 1998).

1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A dengue tem uma ampla variedade de apresentações, muitas vezes com evolução clínica e diagnóstico imprevisível (WHO, 2009). Enquanto a maioria dos pacientes recupera-se de um curso clínico autolimitante e não grave, um pequeno percentual apresenta uma doença de maior gravidade, caracterizada principalmente por extravasamento de plasma acompanhado ou não de hemorragia (WHO, 2009). Em 2009 a WHO propôs uma nova classificação para os casos de dengue focando-se nos níveis de severidade. O novo critério classifica os pacientes em dois grupos: “sem sinais de alarme” (Febre da Dengue) e “com sinais de alarme” (Febre Hemorrágica) podendo evoluir para a síndrome do choque da dengue (WHO, 2009; BÄCK; LUNDKVIST, 2013).

Após um período de incubação (média de 4 a 7 dias) a apresentação clássica da FD (Febre da Dengue) inicia com uma febre alta e repentina que pode durar de 2 a 10 dias e é frequentemente acompanhada por sintomas como: dores de cabeça, dor retro-orbital, mal-estar, dores musculares e articulares. Alguns pacientes podem também apresentar pequenas hemorragias denominadas petéquias, que estão associadas a uma trombocitopenia branda a grave (FIELDS, 2013; WHO, 2009; BÄCK; LUNDKVIST, 2013). Não há um conjunto de

sinais e sintomas específicos que possam diferenciar a FD de outras síndromes virais agudas (FIELDS, 2013).

A dengue grave FHD/SCD (Febre Hemorrágica da Dengue/Síndrome do Choque da Dengue) ocorre em uma segunda fase da doença conhecida como fase crítica. Após o período de defervescência da febre inicial (FD), sinais de alerta são observados. Evidencia-se o surgimento de manifestações hemorrágicas que resultam em um aumento da permeabilidade vascular e acúmulo de fluídos. Dificuldade respiratória /choque também são observados e acompanhados de sangramento severo ou grave podendo levar ao comprometimento de alguns órgãos (BÄCK; LUNDKVIST, 2013; ROTHMAN, 2011; SCREATON, 2013, FIELDS, 2013).

1.5 IMUNOPATOLOGIA

1.5.1 Resposta imune mediada por células, citocinas e sistema complemento

Células T possuem um papel importante tanto na patogênese quanto na proteção da dengue, isto porque são capazes de reconhecer células infectadas, responder com funções efetoras, incluindo proliferação, lise das células alvo e produção de citocinas (KURANE et al., 1989; BUKOWSKI et al., 1989; ROTHMMAN, 2011).

A associação de sintomas graves da dengue com um rápido declínio da carga viral seguido de um pico de secreções de citocinas pró-inflamatórias faz se suspeitar que isso ocorra através de resposta imune mediada por células T (ROTHMAN, 2004).

Células T CD4+ e T CD8+, específicas para o vírus da dengue, demonstraram capacidade *in vitro* de lise de células infectadas pelo vírus. Entretanto, essas células possuem reatividade cruzada e podem ser ativadas durante uma segunda infecção por outro sorotipo, podendo contribuir para a forma grave da doença. Em resposta ao reconhecimento do antígeno via complexo MHC (complexo principal de histocompatibilidade), uma ampla gama de citocinas é produzida, entre elas: IFN γ , TNF, IL-2, CCL4 e menos comumente IL-4 (KURANE et al., 1989; BUKOWSKI et al., 1989; MANGADA., ROTHMAN, 2005; BASHYAN et al., 2006; DONG et al., 2007).

Os DENV possuem uma variedade de 30 a 35% em suas sequências de aminoácidos encontrados na proteína E (SCREATON, 2015) o que pode afetar a geração de anticorpos específicos para cada sorotipo. Os receptores de célula T reconhecem sequências de

aminoácidos similares entre os sorotipos, entretanto, essas poucas diferenças podem interferir na resposta dessas células. Essas diferenças podem prejudicar a interação e predileção entre o complexo peptídeo - MHC de células infectadas e os receptores de células T específicas para o vírus, gerando consequências em suas respostas funcionais (DONG et al., 2007; FRIBERG et al., 2011). Isto foi verificado através de testes utilizando peptídeos sintéticos. Enquanto um induziu resposta de lise celular e uma ampla gama de citocinas, o outro, o qual possuía apenas um resíduo de aminoácido alterado, gerou uma resposta fraca na produção de citocinas, como INF_{γ} e lise celular ineficiente (ROTHMAN, 2011).

No caso de infecções por outros sorotipos, acredita-se que após uma intensa ativação de células T de memória, uma cascata de citocinas é ativada causando o aumento da permeabilidade vascular (ROTHMAN, 2011; KURANE et al., 1997). A alta concentração de citocinas como INF_{γ} , TNF_{α} , IL-2, IL-6, IL-1- β e IL-8 é observada em soro de pacientes com FHD e SCD. Outro fato observado é o sinergismo entre citocinas como INF_{γ} , INF_{α} e IL-1, as quais induzem o aumento da permeabilidade vascular. O contrário é observado quando suas atividades individualmente são comparadas (KURANE et al., 1997). Além disso, o INF_{γ} é capaz de aumentar o número de receptores FcR (receptor Fc) em monócitos e macrófagos, contribuindo com o aumento da replicação viral (BURKE, 1993). JESSIE et al. (2004), sugeriram que os danos encontrados em células endoteliais humanas em tecidos de pacientes com FHD está relacionada com a alta produção de citocinas, consequência direta da infecção. A presença de antígenos virais em células endoteliais foi considerada devido ao complexo antígeno – anticorpo, ao invés da replicação viral que ocorre em monócitos e macrófagos.

A ativação do complemento, mediada pela proteína NS1 do vírus da dengue, pode contribuir para a alteração da permeabilidade vascular. Estudos sugerem que altas concentrações de proteína NS1, peptídeos mediadores de inflamação C3a e C5a e o complexo terminal C5b – C9, estão presentes no plasma e em fluídos pleurais de pacientes com FHD/SCD. Além disso, a proteína NS1 pode ter uma função imunomodulatória, alterando a via clássica e a via da lectina do complemento, uma vez que reduz a capacidade funcional de C4 (AVIRUTNAN et al., 2006; 2010).

1.5.2 Resposta imune mediada por anticorpos

A resposta imune humoral desempenha um importante papel no controle e disseminação viral (BÄCK; LUNDKVIST, 2013).

Ao longo da vida, um indivíduo pode ser infectado em diversas ocasiões pelo vírus da dengue, sendo que na infecção primária há produção de anticorpos específicos contra um sorotipo. Dessa forma, estes indivíduos desenvolvem imunidade protetora de longo tempo (imunidade homotípica) a qual os protege de uma reinfeção pelo mesmo sorotipo. Uma imunidade protetora transitória para outros sorotipos pode ocorrer, pois os diferentes sorotipos virais possuem sequências de aminoácidos semelhantes, desenvolvendo uma reatividade cruzada de anticorpos gerados contra diferentes proteínas virais (ROTHMAN, 2011; BÄCK; LUNDKVIST, 2013; WAHALA et al., 2011). A reatividade cruzada desses anticorpos é capaz de formar agregados de vírus – anticorpo os quais são posteriormente fagocitados. A concentração desses anticorpos, acima de um limiar, proporciona uma imunidade heterotípica. Entretanto, esta imunidade é transitória uma vez que a concentração desses anticorpos diminui com o tempo tornando o indivíduo susceptível a uma nova infecção por um sorotipo diferente. (SABIN, 1952; ROTHMAN, 2011; BÄCK; LUNDKVIST, 2013; WHITEHORN; SIMMONS, 2011; WAHALA et al., 2011). Anticorpos neutralizantes, sorotipo específicos, gerados na primeira exposição, não dependem destes agregados para realizar uma neutralização eficiente e podem ser detectados anos após a primeira infecção (CHAN et al., 2011).

Em uma segunda infecção, células de memória B e T são reativadas e suas respostas podem ser mais rápidas do que a resposta de linfócitos virgens durante a fase aguda da infecção secundária. A isso, chamamos de “pecado do antígeno original”, o qual poderá ter um significado ímpar na gravidade da doença (WAHALA et al., 2011).

O aumento do risco de doença grave em uma segunda infecção está baseada também na teoria descrita por Hawkes (1964) e mais tarde observada por Halstead (1976), conhecida como “aumento da infectividade dependente de anticorpos” ou ADE (do inglês *Antibody Dependent Enhancement*) (HAWKES, 1964; HALSTEAD, 1976; WAHALA et al., 2011; SCREATON et al., 2015). O fenômeno da ADE presume que anticorpos heterotípicos gerados em uma primeira infecção falham ao neutralizar o sorotipo de uma infecção atual. Esses anticorpos de reatividade cruzada, não – neutralizantes e uma concentração abaixo de um limiar necessário para a neutralização, contribuem com o

aumento no número de células infectadas e, por consequência, a replicação viral (BÄCK; LUNDKVIST, 2013; ROTHMAN, 2011, WAHALA et al., 2011).

A ADE envolve a entrada do complexo vírus – anticorpo através de FcR localizados na superfície celular principalmente de monócitos e macrófagos, o que resulta no aumento da infecção viral (KURANE et al., 1991; YACOUN, 2013; SIMMONS et al., 2012., SCREATON et al., 2015). O complexo vírus – anticorpo é mais eficiente do que a entrada do vírus através de receptores de superfície celular (ROTHMAN, 2011). Desta forma, monócitos e macrófagos são consideradas as principais locais de replicação do vírus *in vivo* (SCREATON et al., 2015).

Anticorpos são produzidos contra várias proteínas do vírus da dengue, entre os principais alvos da resposta imune humoral estão as proteínas estruturais pr-M, envelope e capsídeo (ROTHMAN, 2011; WAHALA et al., 2011). Anticorpos contra proteínas não - estruturais NS1, NS3 e NS5 também são reportados durante infecções primárias e secundárias de dengue (CHURDBOONCHART et al., 1991; OLÁN, 2008; KONO, 1990; ROTHMAN, 2011).

A neutralização da infecção da dengue por anticorpos pode ocorrer por dois mecanismos diferentes: o bloqueio à ligação aos receptores de superfície celular e a inibição da fusão da membrana viral com o endossoma (THULLIER, 2001; VOGT, 2009). Esses mecanismos parecem ser determinados por três importantes fatores: afinidade, concentração de anticorpos e a acessibilidade aos epítomos.

A neutralização por anticorpos requer um nível mínimo de ocupação para que a infecção seja bloqueada. Para anticorpos monoclonais com atividade neutralizante mais potente, pelo menos 30 a 180 subunidades da proteína E devem ser ocupadas para que a neutralização ocorra. Entretanto, anticorpos com baixa capacidade neutralizante precisam ocupar um número muito maior de subunidades. Contudo, mesmo os anticorpos neutralizantes mais potentes, quando abaixo da concentração mínima requerida, podem desencadear o fenômeno ADE (PIERSON et al., 2007). O mecanismo de neutralização do vírus e o fenômeno da ADE são apresentados na Figura 2.

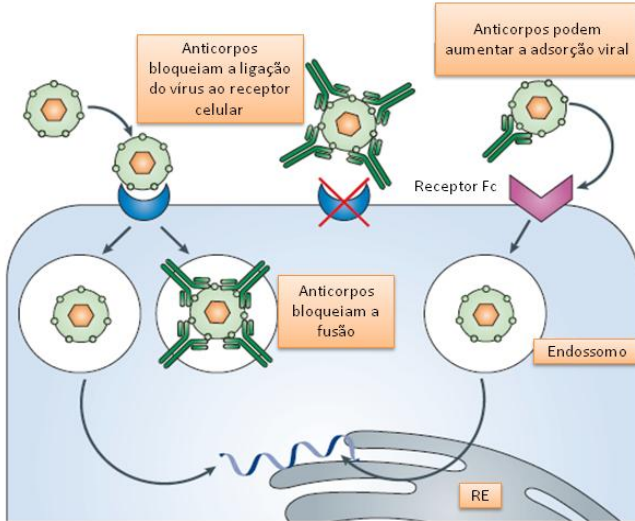


Figura 2. Mecanismo de neutralização e ADE. Partículas virais ligam-se aos receptores de superfície celular e iniciam a replicação viral na célula hospedeira. Uma alta concentração de anticorpos pode bloquear a entrada do vírus na célula, impedindo a ligação aos receptores celulares. Este bloqueio também pode ocorrer após endocitose. Baixas concentrações de anticorpos facilitam a entrada do vírus através da interação aos receptores Fc, facilitando sua replicação. Adaptado de: Alan L. Rothman, 2011.

1.6 GLICOPROTEÍNA E

A glicoproteína E é a maior proteína da superfície dos *Flavivirus*, com 53 kDa, e também a maior determinante antigênica das partículas virais. Ela desempenha um papel fundamental, mediando a ligação do virion ao receptor e a fusão à membrana da célula hospedeira. No vírus maduro, a proteína E está organizada em 30 aglomerados de três dímeros paralelos. Cada monômero possui três domínios, E-DI, E-DII e E-DIII (Figura 3), sendo que E-DIII está provavelmente envolvido no reconhecimento do receptor principal da célula e E-DII parece participar da ligação inicial ao receptor auxiliar. Epítopos neutralizantes são agrupados na extremidade de E-DII, na região da dobradiça entre E-DI e E-DII, e na superfície lateral de E-DIII (LOK et al., 2008).

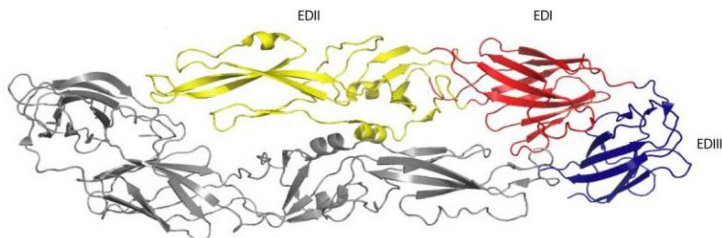


Figura 3. Estrutura tridimensional da glicoproteína E do vírus da dengue. Proteína E em conformação dimérica, apresentando suas regiões de domínio. EDI em vermelho, EDII em amarelo e EDIII em azul (FLEITH, 2014).

Dentro do domínio E-DII foi identificada uma porção altamente conservada constituída por 21 aminoácidos, presentes nos quatro sorotipos, denominada $E_{250-270}$, que é exposta somente na conformação trimérica da proteína dentro do endossomo (Figura 4) (FLEITH, 2014).

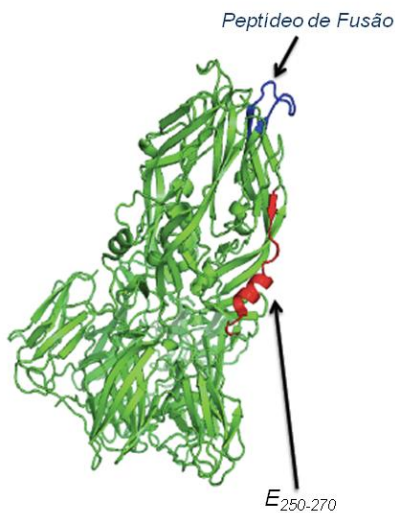


Figura 4. Regiões conservadas da Glicoproteína E. Conformação trimérica da proteína E, em azul peptídeo de fusão e em vermelho peptídeo $E_{250-270}$ (FLEITH, 2014).

A identificação desse peptídeo $E_{250-270}$ foi realizada a partir do alinhamento de sequências da proteína E (Figura 5), analisando o grau de conservação de cada aminoácido em 480 sequências de DENV e seu papel na infectividade, através de vírus recombinante mutante. Os resultados sugerem que mutações na sequência de $E_{250-270}$, têm

implicações importantes na infectividade viral (FLEITH, 2014; CHRISTIAN et al., 2013).

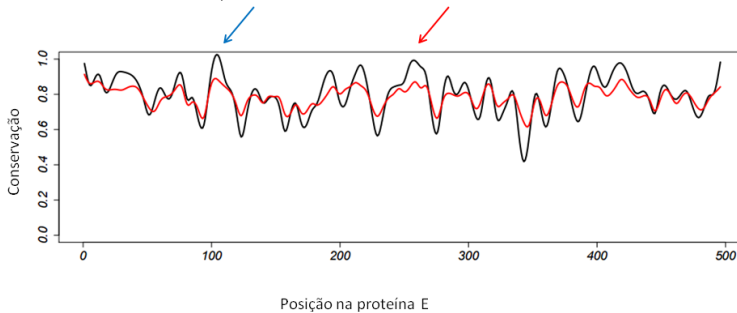


Figura 5. Perfil de conservação dos aminoácidos nos DENV. A frequência de cada aminoácido por posição, de 480 sequências dos quatro sorotipos, é expressa em valores relativos, onde zero (0) representa nenhuma identidade e um (1) cem por cento de identidade. Linha preta indica o alinhamento das sequências de aminoácidos e a linha vermelha a sequência de nucleotídeos. A seta azul indica o peptídeo de fusão e a seta vermelha apresenta o peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀ (FLEITH, 2014).

Uma vez que estudos indicam que mutações nas sequências de E₂₅₀₋₂₇₀ interferem na replicação do vírus da dengue e sendo esta uma região conservada nos quatro sorotipos, a hipótese do presente trabalho é de que **exista anticorpos direcionados contra o peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀ em humanos infectados com o DENV.**

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de anticorpos anti-peptídeo E₂₅₃₋₂₇₀ em soro de pacientes com dengue.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Expressar a proteína GST fusionadas ao peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀;
- Gerar anticorpos monoclonais anti-peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀;
- Desenvolver ELISA indireto contra peptídeo E₂₅₃₋₂₇₀;
- Analisar a presença de anticorpos anti-peptídeo no soro de doadores saudáveis e pacientes com dengue em fase aguda.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

3.1.1 Clonagem e transformação do gene que codifica para a proteína recombinante GST_E₂₅₀₋₂₇₀

A clonagem do gene que codifica para a proteína recombinante GST_E₂₅₀₋₂₇₀ no vetor de expressão pET41a (Novagen, EUA) foi realizada pela empresa *Genscript*, EUA.

O processo de transformação foi realizado pelo método de “choque térmico”, utilizando cerca de 250 ng do DNA recombinante em bactérias *Escherichia coli* cepa TOP10 cálcio - competente. O DNA plasmidial foi adicionado às células competentes, que foram homogeneizadas delicadamente e permaneceram em gelo por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas em temperatura de 42 °C por 45 segundos, e, então, mantidas em gelo por 2 minutos. Foram adicionados 300 µL de meio SOC sem antibiótico e as células permaneceram incubadas a 37 °C, 120 rotação por minuto (rpm) por 1 hora. As células foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) – 1,5 % ágar, acrescido de 30 µg / mL de Kanamicina, e mantidas em estufa a 37 °C por 16 horas.

Para o isolamento do DNA plasmidial, algumas colônias foram selecionadas aleatoriamente e inoculadas em 3 mL de meio LB acrescido de 30 µg / mL de Kanamicina. O inoculo foi mantido em estufa a 37 °C, 120 rpm por 16 horas. A extração do DNA foi realizada por *Kit PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega, USA) conforme recomendação do fabricante e quantificado em equipamento *NanoVue™ Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare, EUA).

Os clones foram testados quanto à presença do gene de interesse, por técnica de digestão enzimática e sequenciamento realizado pela empresa Myleus Biotecnologia, BR. Os plasmídeos extraídos das colônias transformantes, foram digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *XhoI* (Promega, EUA) a 37 °C por 4 horas. Os produtos da digestão foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 3 %.

3.1.2 Proteína recombinante KLH_E₂₅₃₋₂₇₀

A proteína recombinante KLH_E₂₅₀₋₂₇₀ foi construída pela empresa *Genscript*. A KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*) é uma proteína encontrada em um molusco da espécie *Megathura crenulata*.

Esta proteína foi sintetizada, assim como o peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀, entretanto, a sequência do conservado peptídeo sofreu algumas alterações. Os três resíduos de valinas na porção N-terminal, foram removidos para que sua síntese pudesse ser realizada, conforme a sequência a seguir: LGSQEGAMHTALTGATEI.

3.1.3 Expressão de proteína quimérica GST_E₂₅₀₋₂₇₀

Para a expressão da proteína quimérica GST_E₂₅₀₋₂₇₀, 250 ng do plasmídeo sintético foram transformados em bactérias *Escherichia coli* BL21DE3 cálcio competente e *Escherichia coli* BL21 *códon plus* pelo método de “choque térmico” previamente descrito. A seleção das colônias positivas foi realizada em meio LB – 1,5 % ágar, contendo 30 µg / mL de Kanamicina.

A expressão da proteína recombinante GST_E₂₅₀₋₂₇₀ em *E. coli* BL21 cálcio competente foi realizada em 1 L de meio LB contendo 30 µg / mL de Kanamicina e 1 mM do indutor IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo) (Calbiochen, EUA) à temperatura de 37 °C, 120 rpm por 3 horas. Após o tempo de indução, as bactérias foram centrifugadas (centrífuga *Eppendorf*, DE, modelo *centrifuge 5810R*) em tubos cônicos de 50 mL, a 4 °C, 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as bactérias resuspensas em 5 mL de tampão de lise (Tris - HCl 25 mM, pH 8,0 contendo, NaCl 500mM, imidazol 20mM, 1% de triton x100, β – mercaptoetanol 10 mM e inibidor de protease *HaltTM Protease inhibitor cocktail 100x* (Thermo Scientific, EUA)). A lise celular foi realizada em banho de gelo, por seis ciclos de 30 segundos de sonicação com potência de 85 % (sonicador Fisher Scientific, EUA, modelo 120). Em seguida, o lisado celular foi incubado com nuclease universal (Pierce - Thermo Scientific, EUA) por 30 minutos em temperatura ambiente e, então, centrifugado a 4 °C, 13.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante correspondente à FS (fração solúvel) foi transferido para tubos novos.

A expressão da proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀ realizada em *E. coli* BL21 *códon plus* seguiu basicamente a mesma metodologia descrita acima, com algumas modificações. A expressão foi realizada em 1 L de meio LB contendo 30 µg / mL de Kanamicina e 1 mM do indutor IPTG à

temperatura de 27 °C, 120 rpm por 6 horas. Após o tempo de indução, as bactérias foram centrifugadas em tubos cônicos de 50 mL, a 4 °C, 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as bactérias resuspendidas em 5 mL de tampão de lise, a qual foi realizada em banho de gelo, por seis ciclos de 30 segundos de sonicação com potência de 85 %. Em seguida, o lisado celular foi incubado com nuclease universal por 30 minutos em temperatura ambiente e, então, centrifugado a 4 °C, 13.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante correspondente à FS (fração solúvel) foi transferido para tubos novos e utilizado para a etapa de purificação da proteína quimérica.

3.1.4 Purificação da GST_E₂₅₀₋₂₇₀ por cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) em coluna de níquel

A purificação da proteína recombinante GST_E₂₅₀₋₂₇₀ foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando-se equipamento Äkta Avant 25 (GE Healthcare Life Sciences, EUA). Aproximadamente 6 mL da fração solúvel contendo a proteína recombinante, a qual possui fusionada ao peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀ uma cauda de histidina na porção C-terminal, sendo aplicada em coluna de níquel HisTrap FF de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences, EUA). Para tanto, foi realizado um gradiente de eluição com o tampão A (Fosfato de sódio 20 mM contendo NaCl 0,5 M, imidazol 30 mM, pH 7,4) e tampão B, cuja constituição varia apenas na concentração de Imidazol que passa a ser de 500 mM. O método de purificação seguiu as especificações descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Método de purificação por cromatografia de afinidade à histidina em coluna Histrap FF de 1 mL.

Equilíbrio	Porcentagem de B – 0% 20 CV
Injeção da amostra	Bomba de amostra: 6 mL 1 mL/min
Lavagem da coluna	Porcentagem de B – 0% 30 CV
Eluição	Eluição gradiente Porcentagem de B 20 CV
Equilíbrio	Porcentagem de B – 0% 10 V

Ao final da purificação, as frações referentes ao pico obtido foram coletadas e adicionou-se inibidor de protease. Em seguida, as frações foram avaliadas em gel de poliacrilamida – SDS, separação 12 % e concentração 4 %, através de coloração por nitrato de prata. As frações foram então concentradas em centricon 50 kDa (Amicon – Merck Millipore, DE) para um volume final de 500 µL.

3.1.5 Purificação da GST_{E250-270} por cromatografia líquida de proteína (FPLC) em coluna de Glutathione – S – transferase.

As frações referentes à purificação da proteína GST_{E250-270} por afinidade à histidina em coluna HisTrap, foram novamente purificadas por coluna de afinidade – GST (*Glutathione HiCap Cartridges*, Qiagen, DE) utilizando-se equipamento Äkta Avant 25. Para a nova purificação, o volume de 500 µl da proteína foi adicionado ao sistema. Para tanto, um gradiente de eluição com o tampão A (PBS 1 X (fosfato monossódico 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2) contendo DTT (ditiotreitól) (Invitrogen, EUA) 1 mM, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 1 mM) e tampão B (Tris 50 mM, pH 8,0 contendo NaCl 0,4 M, GSH (L-glutathiona) 50 mM, triton 100X a 0,1 % e DTT 1 mM) foi realizado conforme recomendação do fabricante. O método de purificação seguiu as especificações descritas no Quadro 2.

Quadro 2. – Método de purificação por cromatografia de afinidade à GST em coluna *Glutathione Affinity Cartridges* de 5 mL.

Equilíbrio	Porcentagem de B – 0% 10 CV
Injeção da amostra	Bomba de amostra: 500 µL 1,5 mL/min
Lavagem da coluna	Porcentagem de B – 0% 10 CV
Eluição	Eluição gradiente Porcentagem de B 15 CV
Equilíbrio	Porcentagem de B – 0% 5 CV

Ao final da purificação, as frações correspondentes aos picos obtidos foram coletadas e avaliadas em gel de poliacrilamida – SDS,

separação 12 % e concentração 4 %, através de coloração por prata e *western blot*.

3.2 WESTERN BLOT

Para a realização do *western blot*, as amostras obtidas da purificação foram aplicadas em gel de poliacrilamida – SDS, separação 12 % e concentração 4 %, e submetidas a eletroforese utilizando tampão de corrida tris-glicina nas condições 100 V / 80 mA. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, EUA) por 2 horas, utilizando-se o módulo de transferência molhado XCell II™ Blot Module 25 V / 100 mA (Life Technologies, USA), seguindo as especificações do fabricante. Ao término da transferência a membrana foi lavada durante 5 minutos, sob agitação, em tampão de lavagem Tris Buffer Saline (TBS 1 X + 0,1% de Tween-20). Em seguida, foi bloqueada em solução de bloqueio (TBS 1 vez + 0,1 % Tween-20 + 5 % leite em pó) por 1 hora, sob agitação. Após, a membrana foi lavada 3 vezes, em solução de lavagem por 5 minutos. Posteriormente foi incubada por 16 h a 4 °C sob agitação constante com anticorpo primário anti - Histag (Sigma, EUA) na diluição 1:20.000 em solução contendo BSA (*bovine serum albumins*) (TBS 1 vez + 5 % de BSA). Após a incubação, a membrana foi novamente lavada por três vezes e incubada com anticorpo secundário anti-IgG murino, ligado a HRP (Cell Signaling Technology, EUA), na diluição de 1:15.000, em tampão de bloqueio por mais 1 h em temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi lavada 5 vezes e a revelação realizada utilizando-se o kit ECL (Pierce), de acordo com as instruções do fabricante. A revelação foi realizada utilizando filme *hyperfilm*™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) em máquina reveladora (Konica Minolta, modelo SRX-101A, EUA).

3.3 COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA

Após a eletroforese, a revelação do gel foi realizada utilizando-se a coloração por nitrato de prata. O gel foi fixado em solução fixadora (ácido acético 5 % e etanol 50 %) por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi descartada e o gel lavado durante 10 minutos, sob agitação, com 200 ml da solução de lavagem (etanol 50 %). Após, foram adicionados 100 ml de água Milli - Q e o gel incubado por 10 minutos sob agitação. Ao término deste período, foram adicionados 200 ml da solução de sensibilização (0,02 % de tiosulfato

de sódio) sob agitação durante 2 minutos. Em seguida, o gel foi lavado 2 vezes com água Milli-Q por 2 minutos e corado em 200 ml de solução de prata (0,1 % de nitrato de prata) durante 10 minutos em temperatura ambiente. Finalizado esta etapa, uma breve lavagem com água Milli-Q foi realizada e em seguida foi adicionado 200 mL da solução reveladora (2 % de carbonato de sódio). Após a solução já estar em contato com o gel, foram adicionados 80 µl de formaldeído. O gel permaneceu em contato com a solução reveladora até o aparecimento da cor. Para interromper a reação, foram adicionados 200 ml de solução de parada (5 % de ácido acético) e o gel mantido nessa solução até a documentação.

3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD

A dosagem da proteína quimérica GST_E₂₅₀₋₂₇₀ foi realizada através do método de dosagem de proteína *Bradford*. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços e, para a curva padrão, foi utilizado albumina na concentração inicial de 1,5 mg / mL até 0,125 mg / mL. Em seguida, a amostra foi diluída em diferentes diluições: 1:10.000, 1:1000, 1:100 e 1:10, em água Milli - Q e, posteriormente, adicionada a cada poço independente da placa. Após, foi adicionado o reagente diluído 1 vez e a solução foi homogeneizada e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. A leitura da coloração obtida foi feita em uma multileitora de placa (Multileitora Infinite M200 TECAN) no comprimento de onda de 595 nm. Foi obtido uma concentração de 3,02 mg / mL de proteína. A mesma foi encaminhada ao Instituto Carlos Chagas (ICC), Fiocruz/PR (Curitiba) para que fossem iniciados os ensaios de imunização para a obtenção de anticorpos monoclonais.

3.5 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

A imunização dos animais foi realizada no -ICC/Fiocruz de Curitiba-PR, pelo Dr. Juliano Bordignon. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFPR, sob o protocolo 23075.031314/2008-41.

Quatro camundongos fêmeas BALB/c de 6 semanas de idade foram imunizados seguindo protocolo dose-reforço. Foi administrado via intra peritonial 50 µg de proteína KLH_E₂₅₀₋₂₇₀ com adjuvante hidróxido de alumínio gel (Alu-S-Gel) na proporção 1:1 no volume máximo de 200 µL / animal. Foram realizadas 2 doses com intervalo de 14 dias entre as mesmas. A terceira dose reforço foi administrada utilizando a proteína recombinante GST_E₂₅₀₋₂₇₀ nas mesmas

concentrações que a proteína recombinante KLH_E₂₅₀₋₂₇₀ com adjuvante Alu-S-Gel 1:1. A quarta e última dose foi realizada via endovenosa sem adjuvante na concentração de 50 µg da proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀, sendo volume máximo de 100 µL / animal. Três dias após a última imunização os animais foram sacrificados, através do método de deslocamento cervical. O soro dos animais foi coletado e armazenado em freezer de -80 °C. O baço dos animais foi retirado para produção de anticorpos monoclonais.

3.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA E₂₅₀₋₂₇₀

A produção de anticorpos monoclonais foi realizada no ICC Fiocruz/PR (Curitiba), pelo Dr. Juliano Bordignon.

3.6.1 Células de Mieloma

Células de Mieloma (P3x63Ag8.653) foram cultivadas em garrafas de cultura e expandidas até aproximadamente $7,5 \times 10^7$ células totais. Em seguida foram transferidas para tubo falcon de 50 mL e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células resuspendido em meio RPMI – 1640 (Gibco), esta etapa foi realizada 2 vezes. Em seguida, o *pellet* de células foi resuspendido em 10 mL de meio RPMI – 1640 (Gibco) as mesmas foram contadas.

3.6.2 Esplenócitos

Em uma placa petri o baço foi depositado juntamente com aproximadamente 8 mL de meio RPMI – 1640 (Gibco) e macerado com auxílio de lâmina histológica. Com o auxílio de uma pipeta, os grumos celulares foram desfeitos e as células foram filtradas com pipeta contendo filtro de nylon. Em seguida o material foi transferido para tubo falcon de 50 mL e completado com meio RPMI (Gibco). Posteriormente as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 5 mL de solução de lise (cloreto de amônia gelado) no pellet de células. O mesmo permaneceu por 5 minutos em banho de gelo. Após, 45 mL de meio RPMI foi adicionado e as células foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm, esta etapa foi repetida por 2 vezes. O sobrenadante foi desprezado e as células resuspendidas em 10 mL de meio RPMI

(Gibco). Em seguida, as células viáveis foram contadas com auxílio de azul de trypan (Gibco).

3.6.3 Fusão

As células de mieloma e os esplenócitos foram misturados na proporção 1:5 respectivamente em um tubo falcon de 50 mL e centrifugados por 10 minutos a 1.500 rpm. Em seguida, as células foram lavadas 1 vez completando o volume do tubo falcon de 50 mL com meio RPMI (Gibco) e centrifugas por 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e, em banho-maria, lentamente adicionou-se 1 mL de PEG 50 % (Sigma) diluído em meio RPMI (Gibco), sobre o botão celular e posteriormente homogeneizado. Em seguida, lentamente adicionou-se 1 mL de meio RPMI e homogeneizou-se por 1 minuto. Foi então adicionado 7 mL de meio RPMI (Gibco) e homogeneizado durante 2 minutos. Após, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em meio RPMI 1640 com SFB 20 %, 2 mM glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e 100 UI/ μ g/mL de penicilina/estroptomicina. Os grumos celulares foram desfeitos com auxílio de pipeta. A concentração final de células foi ajustada para $2,5 \times 10^6$ cel / mL. Foi distribuído 100 μ L / poço da suspensão celular em placa de 96 poços.

Após 24h foi adicionado 100 μ L / poço de meio HAT (SIGMA) para iniciar a seleção de clones de mieloma – esplenócito. A cada 48h seguiu-se a troca de 100 μ L / poço com meio HAT novo por 12 dias. Na sequência foram realizadas mais duas trocas agora com meio HT (SIGMA). Após esse período de seleção dos clones as células foram mantidas em RPMI suplementado conforme descrito no parágrafo anterior.

3.6.4 Triagem dos clones

A triagem dos hibridomas de interesse foi realizada quando as células atingiram uma confluência de 75 %. O procedimento de identificação dos anticorpos de interesse foi realizado por IFI (imunofluorescência indireta).

Inicialmente células C6/36 *Aedes albopictus* (ATCC CRL-1660) foram cultivadas e propagadas em garrafas de cultivo celular, utilizando meio L-15 (*Leibovitz's*, Gibco) contendo gentamicina (Gibco) (25 μ g / mL) e 0,26 % de triptose e permaneceram durante 3 a 4 dias à 28°C.

As células utilizadas para a triagem por IFI foram então plaqueadas em placas de 96 poços, sendo utilizado o mesmo meio descrito anteriormente. Após 16 – 20 horas de incubação, o sobrenadante das células foi coletado e as células foram infectadas com vírus DENV-1 cepa BR-90 MOI:1, em meio completo, por 96 horas em estufa úmida a 28°C e 5 % de CO₂. Posteriormente, o meio foi descartado e as células lavadas 1 vez com PBS 1 X e adicionado em cada poço 200 µL da mistura 1:1 de metanol:acetona. As placas foram armazenadas em freezer a – 20 °C por 1 hora. A mistura foi retirada e a placa deixada secar em temperatura ambiente. Quando secas, foram adicionados 100 µL do sobrenadante de cultura das placas de hibridomas (poços com no mínimo 75% de confluência) e a mesma incubada por 1 hora a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 1 X e em seguida adicionado 100 µL de anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 anti-mouse (1:400) (Invitrogen). As células foram novamente incubadas por 1 hora a 37 °C e posteriormente lavadas com PBS 1 X. A placa foi deixada secar e então, foi adicionado PBS 1 X com 10 % glicerol. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (Leica DMI6000B, DE) usando software LAS AF (Leica).

3.7 CÉLULAS Huh7.5

As células de linhagem de hepatoma humano Huh7.5, foram cultivadas e propagadas em garrafas de cultivo celular, utilizando meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM F12, Gibco, EUA) 1X, suplementado a 10 % SFB e 1 % de penicilina / streptomina (Gibco), à 37 °C em estufa úmida a 5 % de CO₂.

As células utilizadas para ensaios de titulação viral e teste de neutralização por redução de placa (PRNT) foram propagadas em placas para cultura celular de 24 poços. Para tanto, a monocamada celular foi lavada duas vezes com solução salina 0,9 % estéril (Eurofarma, BR) e as células aderidas à garrafa de cultura celular, foram incubadas por 6 minutos com tripsina/ EDTA 0,05 % (Lonza, CH), a 37 °C em atmosfera contendo 5 % CO₂. Após, as células foram centrifugadas por 5 minutos, 1.000 rpm (centrífuga *Eppendorf*, modelo *centrifuge 5810R*) em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas por jateamento rigoroso de pipetagem em meio DMEM F-12, 10 % SFB e 1 % penicilina / streptomina.

Uma alíquota de células foi então diluída 10 vezes em reagente azul de tripan (Gibco) e contada em câmara de Neubauer. Posteriormente a contagem, as células foram diluídas em meio DMEM

F-12, 10 % SFB e 1 % penicilina/streptomicina e distribuídas homogeneamente em placas contendo 24 poços. Foram adicionadas $6,4 \times 10^4$ células por poço. Em seguida, as placas foram mantidas em estufa úmida a 37 °C, 5 % CO₂ por aproximadamente 24 horas ou até a monocamada celular atingir a confluência de 70 - 80 %.

3.8 TITULAÇÃO VIRAL ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE PLACAS DE LISE

Placas de 24 poços utilizadas nas titulações foram preparadas no dia anterior ao experimento, conforme item 3.7. Primeiramente, foram feitas diluições seriadas dos vírus DENV – 2 cepa ICC/266 (10^{-1} a 10^{-6}) em microtubos contendo um volume final de 900 µL de meio DMEM F-12 com 1 % de penicilina / estreptomicina. Em seguida, as células Huh7.5 foram incubadas com 400 µL de cada diluição / poço, em duplicata. O mesmo foi realizado com poços controles aos quais foram adicionados 400 µL de meio DMEM / F12 com 1% de penicilina / estreptomicina sem adição de SFB e vírus. As placas permaneceram incubadas a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO₂, por 90 minutos. Após o período de incubação, o meio foi retirado e acrescentado 500 µL de meio CMC (carboximetilcelulose) (Sigma, EUA) 1,6 %, contendo DMEM/F12 1 x, 10 % SFB, 1 % penicilina/streptomicina por poço. As placas permaneceram incubadas em estufa úmida a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO₂ por aproximadamente 5 a 6 dias. Para a revelação das placas, foi adicionado 1 mL de paraformaldeído 3 % (Sigma, EUA) (em PBS 1x, pH 7,0) e foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS 1 X e incubadas com corante cristal violeta por 30 minutos. As placas foram, então, lavadas em água corrente e as PFUs (unidade formadora de placa) foram contadas.

3.9 TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACA (*PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST – PRNT*)

O ensaio de PRNT foi realizado conforme o Guia da OMS (WHO, 2009) com algumas modificações. Para tal ensaio, células HuH7.5 foram preparadas no dia anterior, conforme descrito no item 3.9.1. Os testes de PRNT foram realizados com o soro dos animais imunizados e o sobrenadante dos hibridomas. Todos os soros utilizados foram previamente inativados a 56 °C por 30 minutos. Em seguida, foram diluídos em meio DMEM / F12 contendo 1 % de penicilina /

streptomicina. As concentrações foram definidas em 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320. Como controle positivo, foi utilizado o anticorpo monoclonal 4G2, gentilmente cedido pelo ICC – Fiocruz (Instituto Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz de Curitiba – PR), o qual foi previamente diluído na proporção de 1:5, e posteriormente diluído nas concentrações definidas. Para o controle negativo, soro de um animal não imunizado foi utilizado, sendo previamente inativado e diluído nas mesmas proporções que o soro imune. Alíquotas virais do DENV – 2 ICC/266 foram tituladas conforme descrito no item 3.8 e diluída em meio DMEM F12, 1 % de penicilina / streptomicina. Foi realizada, uma mistura contendo soro / vírus ou 4G2 / vírus obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 20 PFUs por poço, sendo essa mistura incubada por 90 minutos a 37 °C. Após o período de incubação a mistura foi adicionada as células Huh7.5 e novamente incubadas por 90 minutos, a 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂, sendo homogeneizadas em intervalos de 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e substituído por meio CMC (carboximetilcelulose) 1,6 %, contendo DMEM 1 X, 10 % SFB, 5 % penicilina / streptomicina. As placas foram novamente incubadas a 37 °C, atmosfera de 5 % CO₂ por 5 a 7 dias. Ao final do período de incubação, as células foram fixadas com 1 mL de paraformaldeído 3 %, (em PBS 1 x, pH 7,0) por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS 1 X e incubadas com corante cristal violeta por 30 minutos. As placas foram, então, lavadas em água corrente e as PFUs (unidade formadora de placa) foram contadas e a inibição em porcentagem foi determinada. Para os testes de PRNT realizados com o sobrenadante dos hibridomas, a metodologia empregada foi a mesma descrita acima.

3.10 ELISA INDIRETO CONTRA E₂₅₃₋₂₇₀

O protocolo utilizado para os ensaios de ELISA indireto foi realizado conforme proposto por Marezi (2015), com modificações. Inicialmente, foi feita a sensibilização de placas de 96 poços da marca NUNC Maxisorp (Thermo Scientific, EUA) com 100 µL / poço do peptídeo E₂₅₃₋₂₇₀, na concentração de 1 µg/poço em tampão BBS (Borate Buffered Saline – 0,1 M ácido bórico, 25 mM tetraborado de sódio, 0,15 M cloreto de sódio pH 8,4). Em seguida, as placas foram incubadas *overnight* à temperatura de 4 °C. A solução foi retirada das placas e as mesmas lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS 1 X – 0,1 % Tween 20) usando uma lavadora de microplacas (DYNEX Ultrawash Plus, EUA). O bloqueio foi realizado com 200 µL de tampão de

bloqueio (PBS 1 X – 0,1 % Tween 20 – 0,5 % de gelatina em pó incolor) durante 1 hora a 37 °C. Finalizada a etapa de bloqueio, as placas foram lavadas 8 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados aos poços em duplicata, amostras do soro de pacientes positivos e negativos para dengue (previamente inativados a 56 °C por 30 minutos), na diluição de 1:100 previamente diluídos em tampão de bloqueio. As placas foram incubadas por 2 horas à temperatura de 37 °C. Os poços foram lavados como descrito anteriormente e 100 µL / poço de anticorpo secundário anti-IgG conjugado a peroxidase (HRP- Goat Anti-Human IgG (H + L) Conjugate – ZyMax™ Grade – Invitrogen) na concentração de 1:15.000 diluído em tampão de bloqueio e adicionado as placas. Após 1 hora de incubação a 37 °C, as placas foram lavadas 8 vezes com tampão de lavagem e tratadas com 100 µL / poço de OPD (o-fenilenediamina 1 mg / mL) (Imunopierce, Thermo Scientific, EUA) diluída em tampão citrato fosfato (Tampão citrato 0,05 M, fosfato de sódio dibásico 0,05 M, pH 5,0) com peróxido de hidrogênio 30 % (Dinâmica, BR). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro TECAN (Multileitora Infinite M200 TECAN) a 450 nm durante 30 minutos contínuos, sendo registrada a leitura da placa a cada 1 minuto em temperatura ambiente.

3.11 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES E DOS DADOS CLÍNICOS

A obtenção das amostras foram realizadas nas dependências do ICC / Fiocruz / Curitiba durante o período de agosto de 2012 a março de 2014.

A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Fiocruz / RJ sob o protocolo 617/11.

3.11.1 Pacientes

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido por parte do paciente ou seu representante legal (no caso de menor de idade), foram selecionadas 54 amostras de soro de pacientes com diagnóstico laboratorial positivo para Dengue, avaliados nas diferentes Unidades Básicas de Saúde (UBS) do Município de Cambé - PR. As informações sobre os pacientes, como idade, sexo, sintomas, foram obtidas através da análise da ficha Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e/ou dos prontuários médicos, no caso de

pacientes internados. Como grupo controle negativo, foram selecionadas 28 amostras de pessoas saudáveis.

3.11.2 Critério de inclusão e exclusão

Foram incluídos os pacientes os quais tiveram a confirmação laboratorial de Dengue, sendo excluídos os demais.

3.11.3 Coleta da amostra

As amostras de soro de pacientes foram obtidas por punção venosa periférica (5 mL de sangue), as quais coletadas em tubos sem anticoagulante, sendo o soro separado após a coagulação do sangue (1 h em temperatura ambiente) e centrifugação (3.000 rpm por 5 minutos). Por fim, as amostras foram fracionadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas em freezer – 80° C.

3.11.4 Testes laboratoriais realizados para confirmação de Dengue

Os testes para a confirmação de dengue nas amostras coletadas foram realizados no Instituto Carlos Chagas – ICC Fiocruz de Curitiba-PR, (BORDIGNON, 2014), por método ELISA para dengue NS1 (Panbio, AU), ELISA IgG indireto para dengue (Panbio), ELISA dengue IgM de captura (Panbio) conforme orientação do fabricante, além do isolamento viral, IFI e RT-PCR.

Para os testes de isolamento viral e IFI foram utilizados soros dos pacientes na diluição de 1:10 em meio L-15 (Gibco) contendo gentamicina (25 µg / mL) e 0,26 % de triptose. Em seguida a mistura foi filtrada utilizando filtro de 0,22 µm e células C6/36 *Aedes albopictus* (ATCC CRL-1660; 2.0 x 10⁶ células em garrafa de cultura celular de 25 cm²) foram inoculadas e incubadas por 45 – 60 minutos a 28 °C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e centrifugado, para que as células que se desprenderam da garrafa fossem recuperadas. Terminada a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio L – 15 (Gibco) contendo 5 % de SFB, gentamicina (25 µg / mL) e 0,26 % de triptose e posteriormente adicionadas à mesma garrafa de cultura celular. Foram mantidas em cultura por 7 a 14 dias em temperatura de 28 °C. Após 7 dias uma parte das células foi raspada da garrafa de cultura e adicionada em lâmina para IFI. Estas foram deixadas secando em temperatura ambiente. Em seguida, foram fixadas e permeabilizadas com metanol por 3 minutos e

incubadas com anticorpo anti - flavivirus 4G2 por 30 minutos a 37 °C. As células foram lavadas com PBS diluído 1 x e incubadas com anti-mouse conjugado ao Alexa 488 (Life Technologies) e o núcleo corado com DAPI (300 nM). As imagens foram capturadas com microscópio de fluorescência (Leica DMI6000B) usando software LAS AF (Leica).

Para identificar o sorotipo viral e confirmar os resultados da IFI, foi realizado o teste de RT – PCR. O RNA foi coletado do sobrenadante das células C6/36 extraído com auxílio do Kit QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, DE) conforme instruções do fabricante. O RNA foi usado como modelo para o *one step* RT-PCR (QIAGEN) empregando os iniciadores *forward* D1 e iniciadores *reverse* TS1, TS2, TS3 e TS4, como descritos na Tabela 1. O ciclo de amplificação utilizado foi de 50 °C por 30 minutos, 95 °C por 15 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 57 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, e finalizando com 72 °C por 10 minutos. O produto da amplificação foi analisado em gel de eletroforese (1 %), corado com brometo de etídio. Um mistura do RNA do DENV-1 BR/90 (GenBank: AF226685.2) e DENV – 3 BR/97-04 (GenBank: EF629367.1) e do DENV – 2 ICC/266 e DENV – 4 TVP/360 foram usados como controles positivos.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores para cada sorotipo da dengue.

Iniciadores	Sequência dos iniciadores (5' - 3')
D1	TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG
TS1-	GGTCTCAGTGATCCGGGGG
TS2-	CGCCACAAGGGCCATGAACAG
TS3-	TAACATCATCATGAGACAGAGC
TS4-	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA

3.11.5 Delineamento do Estudo

O fator em estudo é o reconhecimento de uma porção conservada da proteína E, denominada E₂₅₀₋₂₇₀, por anticorpos IgG através da técnica de ELISA indireto no soro de pacientes previamente expostos à dengue.

3.12 ANÁLISE DOS DADOS DO ELISA

Os dados obtidos de uma leitura cinética de 30 minutos em densidade ótica de 450 nm (DO) foram aplicados na fórmula da área sob

a curva (ASC) (RUTTEN, 2014) e um único valor foi obtido. A fórmula utilizada para calcular a área sob a curva foi:

$$\text{Área} = \int_a^b f(x).dx$$

A média da área sob a curva (ASC) dos dois grupos estudados, doadores saudáveis e positivos para dengue, foi submetida a testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett).

Para verificar se os grupos diferiam entre si, foi realizado Teste T de Student. A obtenção do ponto de corte seguindo o critério de máxima sensibilidade e especificidade, foi feita pela curva ROC (*Receiver Operator Characteristics*), com auxílio do pacote *OptimalCutpoints* (LOPEZ et al., 2014). Estas análises foram realizadas na interface R (R Development Core Team, 2008).

4. RESULTADOS

4.1 CLONAGEM DO FRAGMENTO GÊNICO QUE CODIFICA PARA A PROTEÍNA QUIMÉRICA GST_{E250-270}

Com o objetivo de verificar a presença de anticorpos anti – E₂₅₀₋₂₇₀ em soro de pacientes positivos para dengue construiu-se uma proteína quimérica, a qual seria utilizada como antígeno para imunização. Este antígeno foi utilizado para a geração de anticorpos monoclonais contra o E₂₅₀₋₂₇₀, com a finalidade de obter-se um controle positivo para ELISA indireto contra o peptídeo de interesse. Para tanto, foi realizada a clonagem do gene que codifica para a proteína, denominada GST_{E250-270} em vetor pET41a, (realizado pela empresa *Genscript*). O vetor (pET41aGST_{E250-270}) foi amplificado em *E. coli* TOP 10 e sua sequência confirmada através de sequenciamento parcial (dados não mostrados). O gene contendo os nucleotídeos referentes a E₂₅₀₋₂₇₀ também foram confirmados através de análise de restrição enzimática. O produto foi digerido pelas enzimas de restrição *Hind*III e *Xho*I. O fragmento de DNA que corresponde a E₂₅₀₋₂₇₀ foi visualizado em gel de agarose 3%, corado em brometo de etídio (Figura 6).

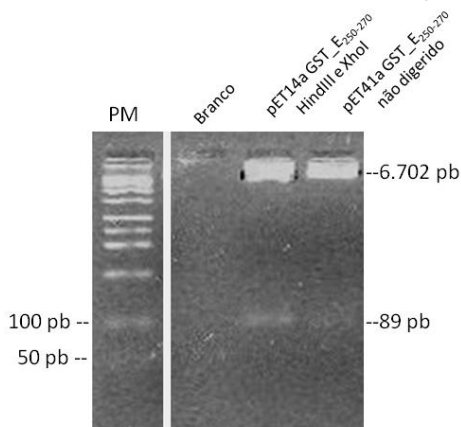


Figura 6 – Análise de restrição do fragmento E₂₅₀₋₂₇₀ em vetor pET41a. O produto gerado após restrição por enzimas *Hind*III e *Xho*I é apresentado em gel de agarose 3%. PM = peso molecular para DNA, pET41aGST_{E250-270} fechado = 6.702 bp e E₂₅₀₋₂₇₀ = 89 pb.

A digestão do plasmídeo gerou um fragmento com 89 pares de bases (pb) correspondente ao fragmento gênico que codifica para o peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀, demonstrando sucesso na clonagem.

4.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GST_E₂₅₀₋₂₇₀ EM CEPA *E. coli* BL21 CÁLCIO COMPETENTE

Uma vez que a sequência do gene que codifica a proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀ foi clonado e sua sequência confirmada, o fragmento gênico foi expresso em *E. coli* BL21DE3 cálcio competente. A proteína produzida foi posteriormente avaliada em gel de poliácridamida-SDS 12 %, corado com *Coomassie blue*.

Proteínas com o peso molecular entre 25 e 37 kDa foram diferencialmente produzidas após a indução com IPTG por 3 horas. O peso molecular esperado para a proteína recombinante é de 25kDa (Figura 7).

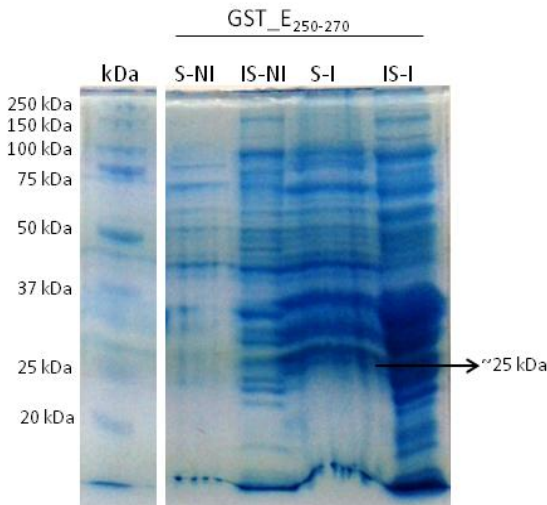


Figura 7. Frações obtidas da expressão da proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀ em bactéria *E. coli* BL21DE3 transformadas com plasmídeo de expressão pET41a. Gel de poliácridamida SDS – 12 % corado com *coomassie blue*. kDa = padrão molecular de proteína S-NI = fração solúvel não induzida com IPTG, IS-NI = fração insolúvel não induzida com IPTG, S-I = fração solúvel induzida com IPTG, IS-I = fração insolúvel induzida com IPTG. GST_E₂₅₀₋₂₇₀ = 25 kDa.

4.3 PURIFICAÇÃO DA GST_E₂₅₀₋₂₇₀ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS EM COLUNA DE NÍQUEL

A fração solúvel induzida por IPTG (S-I) da proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀ foi purificada por cromatografia de afinidade pela coluna de níquel. Foram utilizados dois tampões para a realização da eluição a partir de um gradiente: “tampão A” contendo imidazol 30 mM e “tampão B” imidazol 500 mM, conforme descrito no item 3.1.4. O cromatograma mostrou um pico de absorbância em 280 nm, referentes a um volume de retenção de aproximadamente 53 mL (Figura 8).

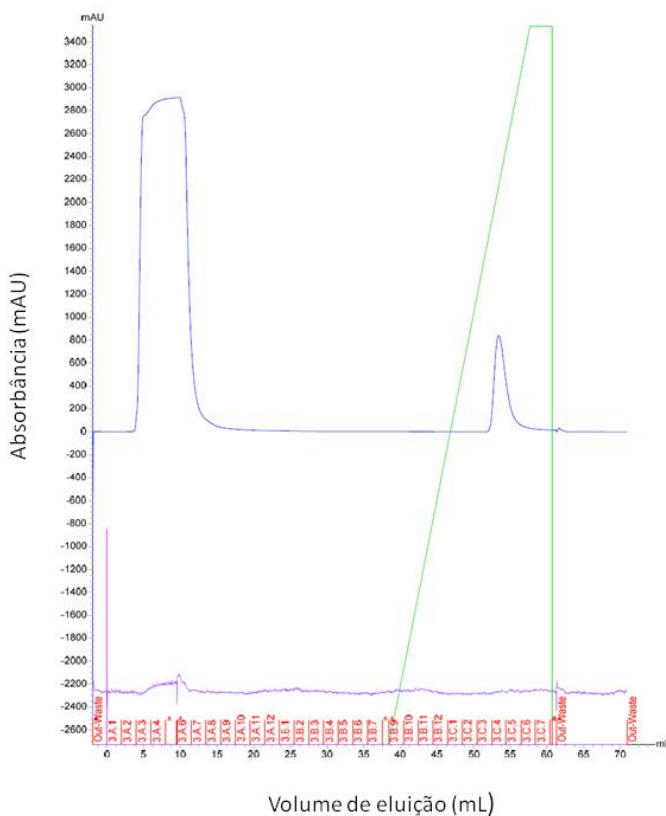


Figura 8. Purificação da GST_E₂₅₀₋₂₇₀ por coluna de afinidade de níquel em FPLC. O cromatograma da purificação apresenta absorvância a 280 nm da proteína quimérica monitorada durante execução de FPLC, por coluna de

níquel. Frações correspondente ao pico (3C4 e 3C5) foram coletados. Linha azul = Absorbância 280 nm, linha verde = % do tampão de eluição B, linha roxa = pH.

As frações 3C4 e 3C5 referentes ao pico gerado foram reunidas e resolvidas em gel de poliacrilamida – SDS 12% e corada por nitrato de prata (Figura 9).

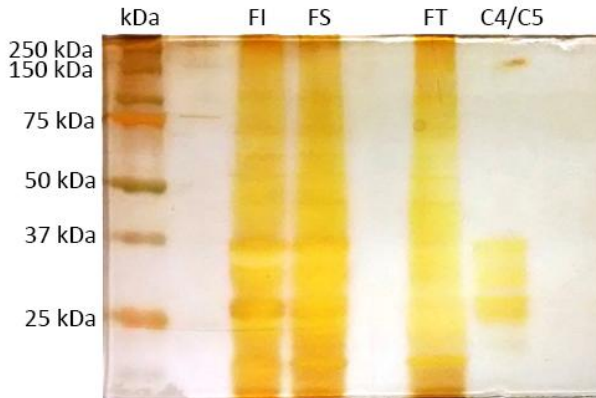


Figura 9. SDS-PAGE corado com nitrato de prata apresentando a fração obtida após a purificação da proteína GST_{E250-270} em coluna de níquel. Gel SDS - PAGE – 12 % corado com nitrato de prata mostrando as amostras C4/C5 correspondentes as frações 3C4 e 3C5 obtidas do pico gerado. kDa = padrão molecular de proteína, FI = fração insolúvel do extrato total de células, FS = fração solúvel do extrato total de células, FT = flow through, C4/C5 = frações da proteína eluída da coluna de níquel.

O peso molecular da proteína GST_{E250-270} presente nas frações C4/C5 apresentou novamente bandas com peso molecular entre 25 e 37 kDa.

4.4 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO C4/C5 POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS EM COLUNA DE AFINIDADE GST

A purificação por coluna de níquel demonstrou a marcação de bandas de diferentes tamanhos. Para confirmar a presença da proteína

GST_E₂₅₀₋₂₇₀ foi realizada nova purificação das frações C4/C5 por coluna de afinidade a GST.

Foram utilizados dois tampões para a purificação: “A” (PBS 1X (fosfato monossódico 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2) contendo DTT 1mM, EDTA 1mM) e “B” (Tris 50 mM, pH 8,0 contendo NaCl 0,4 M, GSH 50 mM, triton 100X a 0,1 % e DTT 1 mM), conforme descrito no item 3.1.5. O cromatograma da purificação apresentou dois picos de absorvância em 280 nm referentes aos volumes de retenção em 87 e 97 mL respectivamente (Figura 10).

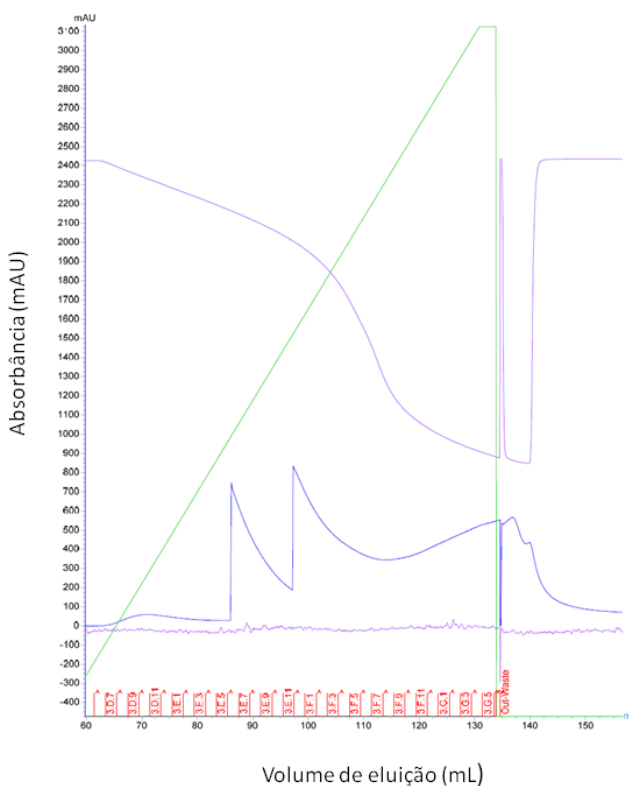


Figura 10. Purificação da GST_E₂₅₀₋₂₇₀ em coluna de afinidade por GST em FPLC. O cromatograma da purificação apresenta absorvância a 280 nm da proteína quimérica monitorada durante execução de FPLC, por coluna de afinidade – GST. Frações de 0,5 mL correspondente a 2 picos (3E6, 3E7, 3E8,

3E9, 3E10, 3E12, 3F1, 3F2, 3F3, 3F4, 3F5 e 3F6) foram coletados. Linha azul = Absorbância 280 nm, linha verde = % do tampão de eluição B, linha roxa = pH.

As 12 frações, 3E6, 3E7, 3E8, 3E9, 3E10, 3E12, 3F1, 3F2, 3F3, 3F4, 3F5 e 3F6 correspondentes aos 2 picos, foram resolvidas em gel de poliacrilamida – SDS 12 %, corado com nitrato de prata (Figura 11 - A).

Novamente foram observadas bandas marcadas entre 25 e 37 kDa e o resultado do *western blot* confirmou este padrão de bandas para a proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀ (Figura 11 - B).

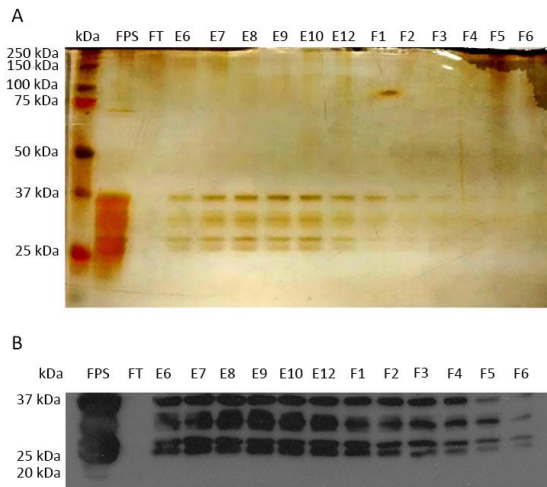


Figura 11. Purificação da GST_E₂₅₀₋₂₇₀ em coluna de afinidade por GST. (A) Gel SDS-PAGE 12 % corado com nitrato de prata mostrando as amostras correspondentes as frações E6, E7, E8, E9, E10, E12, F1, F2, F3, F4, F5 e F6 obtidas dos dois picos. (B) Confirmação da presença da proteína quimérica por *western blot*, nas frações correspondentes aos 2 picos gerados. O anticorpo anti-Histag foi utilizado na diluição 1:20.000. FS = Fração Solúvel do extrato total de células, FT = flow through.

4.5 NOVA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GST_E₂₅₀₋₂₇₀

Uma vez que a proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀ apresentou um padrão de bandas entre 25 e 37 kDa, o que difere em parte dos 25 kDa da proteína interesse, foi optado por expressar o gene que codifica a proteína de interesse em *E. coli* BL21 *códon plus*. O resultado apresentou bandas de proteína entre 25 e 37 kDa nas colunas IS-NI (fração insolúvel não

induzida com IPTG), S-I (fração solúvel induzida com IPTG) e IS-I (fração solúvel induzida com IPTG). Entretanto, a banda mais forte apresentou um tamanho próximo de 37 kDa (Figura 12).

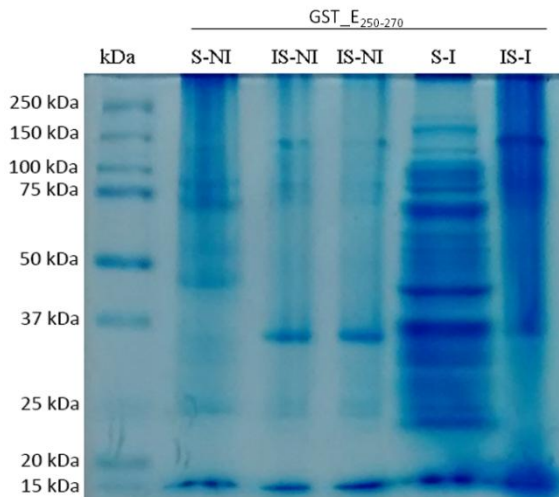


Figura 12. Frações obtidas da expressão da proteína GST_{E250-270} em bactéria *E. coli* BL21 *códon plus* transformadas com plasmídeo de expressão pET41a. Gel de poliacrilamida-SDS 12 % corado com *coomassie blue*. kDa = padrão molecular de proteína S-NI = fração solúvel não induzida com IPTG, IS-NI = fração insolúvel não induzida com IPTG, S-I = fração solúvel induzida com IPTG, IS-I = fração insolúvel induzida com IPTG. GST_{E250-270} = 25 kDa.

4.6 PURIFICAÇÃO DA GST_{E250-270} POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS EM COLUNA DE NÍQUEL.

A fração solúvel induzida com IPTG (S-I) foi utilizada para a purificação em coluna de níquel por FPLC.

Os tampões utilizados foram: tampão A (imidazol 30 mM) e B (imidazol 500 mM), conforme descrito no item 3.1.4. Após a última etapa de purificação foi obtido o cromatograma, com formação de um pico de absorbância em 280 nm referente ao volume de retenção em 25 mL (Figura 13).

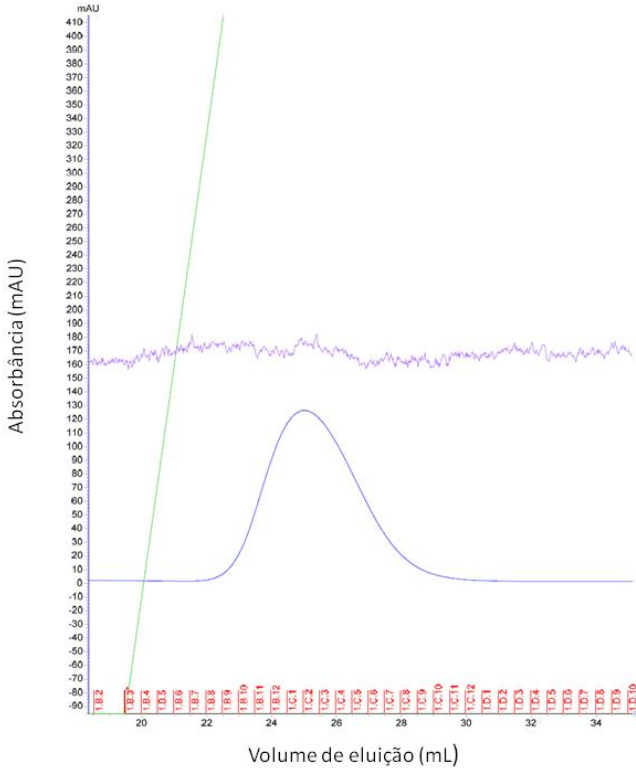


Figura 13. Purificação da GST_E₂₅₀₋₂₇₀ por coluna de afinidade de níquel em FPLC. O cromatograma da purificação apresenta absorbância a 280 nm da proteína quimérica monitorada durante execução de FPLC, por coluna de níquel. Frações correspondente ao pico gerado (1B10, 1B11, 1B12, 1C1, 1C2, 1C3, 1C4, 1C5, 1C6, 1C7 e 1C8) foram coletados. Linha azul = Absorbância 280 nm, linha verde = tampão de eluição B, linha roxa = pH.

As 11 frações evidenciadas apresentaram novamente um padrão de bandas entre 25 e 37 kDa (Figura 14-A).

A confirmação do resultado foi realizada por *western blot*, o qual apresentou uma marcação de banda com maior intensidade para a proteína de 37 kDa (Figura 14-B).

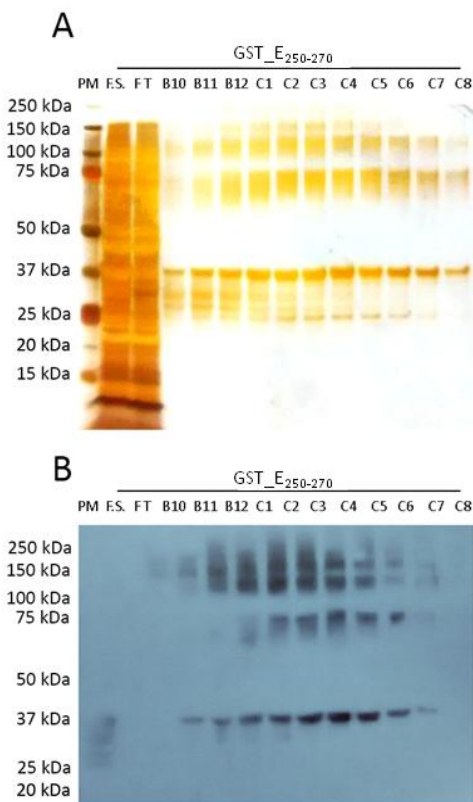


Figura 14. Purificação da GST_{E250-270} em coluna de afinidade por níquel. (A) Gel SDS-PAGE 12 % corado com nitrato de prata mostrando as amostras correspondentes as frações B10, B11, B12, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8 obtidas após purificação. (B) Confirmação da presença da proteína quimérica por *western blot*, nas frações correspondentes ao pico. O anticorpo anti-His foi utilizado na diluição 1:20.000. FS = fração solúvel do extrato total de células e FW = flow through

Ao final, as frações foram coletadas, concentradas e filtradas em centricon de 50 kDa, com o objetivo de retirar as bandas apresentadas acima deste peso, as quais não pertencem a proteína GST_{E250-270}.

Após esses resultados, os pesos moleculares demonstrados pela proteína quimérica diferiram entre os testes realizados, um variando entre 25 e 37 kDa e outra apresentando bandas em 37 kDa. Optou-se pela escolha da primeira proteína.

Efetuiu-se em seguida, a dosagem da proteína por método de Bradford tendo como resultado uma concentração de 3,02 mg / mL de proteína. A qual foi encaminhada para o Instituto Carlos Chagas - ICC Fiocruz de Curitiba-PR, aos cuidados do Dr. Juliano Bordignon, para que fossem utilizadas na geração de anticorpos monoclonais.

4.7 ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA E₂₅₀₋₂₇₀

Para gerar anticorpos monoclonais contra o peptídeo foi realizada uma estratégia de imunização utilizando duas proteínas diferentes: KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ e GST_E₂₅₀₋₂₇₀, seguindo protocolo descrito no item 3.5.

4.8 DETECÇÃO DA PROTEÍNA GST_E₂₅₀₋₂₇₀ E KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ ATRAVÉS DO SORO DE ANIMAIS IMUNIZADOS

Após as imunizações, o soro dos animais imunizados foi avaliado para a presença de anticorpos contra a proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀ através de *western blot*. A amostra da proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀ foi a purificada em coluna de níquel e expressas em *E. coli* BL21 *códon plus*.

O resultado da fração 1.FPF (fração purificada filtrada), reconhecida com anticorpo anti-GST não apresentou marcação. Entretanto, a coluna 3.FNP (fração não purificada) marcada com o soro de animais imunizados contra as duas proteínas demonstrou forte marcação (Figura 15 - A).

A coluna 4.FNP (fração não purificada), marcada com anticorpo anti-GST, apresentou três bandas entre 25 e 37 kDa (Figura 15 - B).

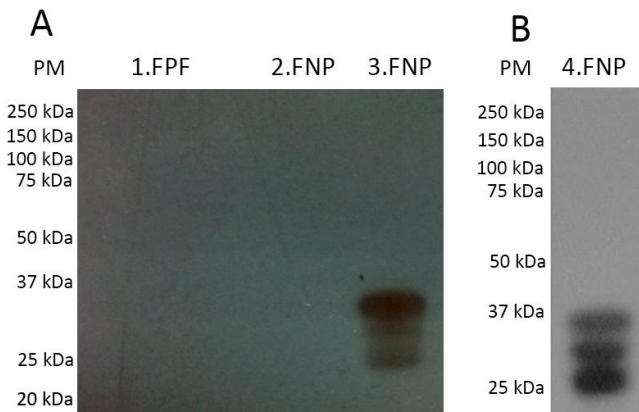


Figura 15. Presença de anticorpos contra proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀ gerados após ensaio de imunização. (A) As frações do cromatograma referentes à purificação por coluna de afinidade GST foram testadas para a presença de GST_E₂₅₀₋₂₇₀ pelo soro de animais imunizados contra GST_E₂₅₀₋₂₇₀ e KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ e (B) testadas com anticorpo anti-GST. 1. FPF = Fração purificada filtrada em centrifugador de 3 e 50 kDa da proteína quimérica (1:50), incubada com Ac anti-GST (1:200), 2. FNP = fração não purificada incubada com soro de animais não imunizados, 3. FNP = fração não purificada incubada com soro de animais imunizados (1:200), 4. FNP = fração não purificada incubada com Ac. Anti-GST (1:200). Os experimentos A e B não foram realizados no mesmo dia.

A produção de anticorpos contra a proteína KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ também foi verificada através de *western blot*.

A primeira coluna mostra a marcação da proteína em 50 kDa em concentrações de 5 – 10 µg, sendo esta marcada com o soro dos animais imunizados. O controle utilizando o soro de animais não imunizados não apresentou marcação (Figura 16).

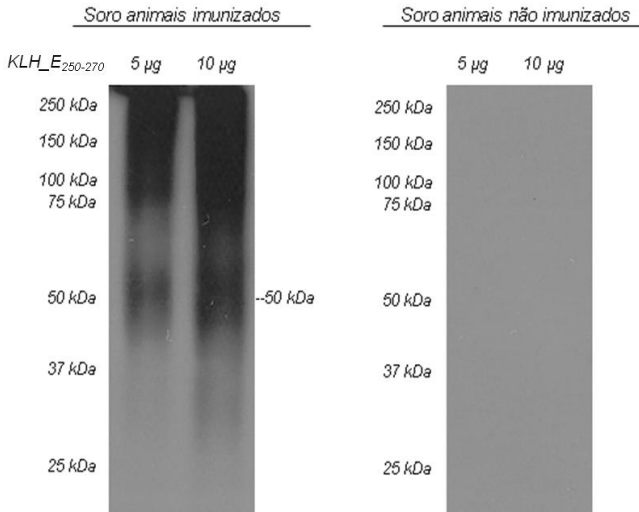


Figura 16. Presença de anticorpos contra proteína KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ gerados após ensaio de imunização. A proteína KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ foi resolvida em gel de poliácridamida-SDS 12 % e transferida para membrana de nitrocelulose. A proteína foi então incubada com o soro dos animais imunizados contra KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ e GST_E₂₅₀₋₂₇₀. Soro de animais imunizados e Soro de animais não imunizados, na diluição de 1:200 e IgG HRP 1:15.000. Peso molecular da proteína KLH_E₂₅₀₋₂₇₀ = 50 kDa.

4.9 FUSÃO E TRIAGEM DOS CLONES

O experimento de fusão gerou um total de 1.355 hibridomas, destes 588 (41 %) atingiram a confluência necessária para serem triados por IFI, em células C6/36 infectadas com cepa DENV-1 BR-90. Dos 588 hibridomas testados, apenas onze apresentaram reatividade contra células infectadas e não-infectadas. Dessa forma, uma nova triagem por IFI utilizando células Huh7.5 foi realizada com o mesmo grupo de clones. O resultado apresentou 8 hibridomas secretando anticorpos contra E₂₅₀₋₂₇₀, entretanto células não infectadas foram marcadas. Embora os clones tenham sido positivos para células não infectadas com DENV-1 cepa BR-90, a atividade neutralizante do sobrenadante dos hibridomas foi testada.

4.10 SORONEUTRALIZAÇÃO - PRNT (PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST - PRNT)

A atividade neutralizante *in vitro* do soro de animais imunizados contra KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ e GST_E₂₅₀₋₂₇₀ foi testada contra DENV-2 ICC/266 (PRNT₂₀).

O soro dos animais não apresentou atividade neutralizante em nenhuma das diluições testadas (Figura 17). O anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como controle positivo e apresentou atividade neutralizante como esperado.

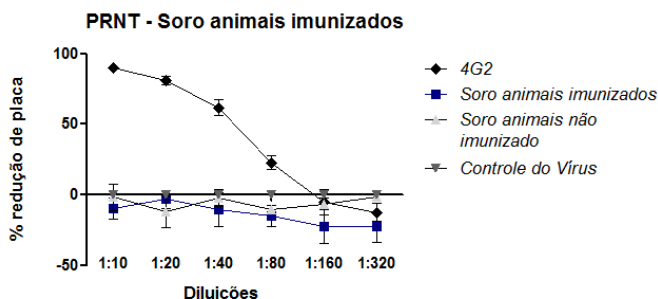


Figura 17. Ensaio da atividade neutralizante do soro de animais imunizados contra KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ e GST_E₂₅₀₋₂₇₀. A atividade neutralizante do soro de animais imunizados foi observada através do ensaio de PRNT. DENV-2 ICC/266 foi incubado em diferentes diluições do soro dos animais imunizados e usado para infectar células Huh7.5. Após 5 a 6 dias as células foram fixadas, coradas, contadas e a inibição em porcentagem foi determinada. Anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como controle positivo. Dados apresentados são referentes a um experimento em triplicata.

O resultado obtido para o teste de soroneutralização dos 8 SND (sobrenadantes de hibridomas) indicou que os mesmos são ineficientes na prevenção da infecção viral e não exibiram atividade neutralizante contra DENV-2 ICC/266 (PRNT₂₀). Entretanto, foi possível observar um pequeno aumento no número de placas nas diluições 1:10, 1:20 e 1:40.

A figura 18 é representativa de todos os sobrenadantes testados, uma vez que apresentaram resultados semelhantes.

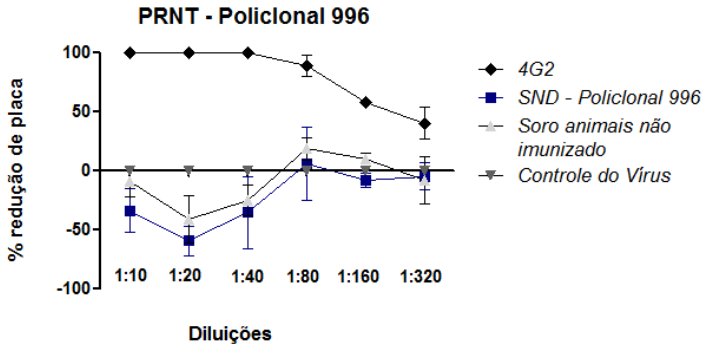


Figura 18. Ensaio da atividade neutralizante do sobrenadante do hibridoma 966 produzido através da imunização de animais contra KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ e GST_E₂₅₀₋₂₇₀. A atividade neutralizante do soro do hibridoma 966 foi observada através do ensaio de PRNT. DENV-2 ICC/266 foi incubado em diferentes diluições do sobrenadante e usado para infectar células Huh7.5. Após 5 a 6 dias as células foram fixadas, coradas, contadas e a inibição em porcentagem foi determinada. Anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como controle positivo. Dados apresentados são referentes a um experimento em triplicata e são representativos dos demais sobrenadantes testados.

Mesmo sem atividade neutralizante, foi realizado ELISA indireto para confirmar a presença de anticorpos no sobrenadante dos hibridomas, utilizando E₂₅₃₋₂₇₀ na fase sólida. O peptídeo sintético utilizado para sensibilizar as placas não possui as 3 valinas iniciais da sequência original, com peso molecular de 1,8 kDa.

Dentre os 8 sobrenadantes testados, nenhum reconheceu o pepE₂₅₃₋₂₇₀. Interessantemente, o soro dos animais imunizados contra o peptídeo, detectou o antígeno viral. Este resultado é representativo dos demais sobrenadantes testados (Figura 19).

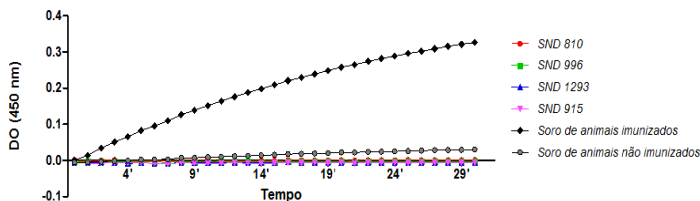


Figura 19. ELISA indireto dos sobrenadantes dos hibridomas testados contra $E_{253-270}$. As amostras foram testadas na diluição 1:100, sendo utilizado pep $E_{250-270}$ na fase sólida. A leitura cinética da DO 450 nm foi realizada a cada 1 minuto, durante de 30 minutos. Linha vermelha = SND 810, linha verde = SND 996, linha azul = SND 1293, linha rosa = SND 915, linha preta fechada = soro de animais imunizados contra KLH_ $E_{253-270}$ e GST_ $E_{250-270}$, linha preta aberta = soro de animais não imunizados, sendo esse o controle negativo. Resultado de um experimento em duplicata.

4.11 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- $E_{253-270}$ EM SORO HUMANO POR ELISA INDIRETO

Para avaliar a presença de anticorpos contra o peptídeo $E_{253-270}$ em soro de pacientes positivos para dengue, foi realizado um ELISA indireto para detecção de IgG gerados contra o peptídeo de interesse.

Um total de 82 amostras foram selecionadas para o estudo, sendo 28 de doadores saudáveis (controle), entre estes, 12 vacinados contra febre amarela e 54 positivas para o vírus da dengue (DV), das quais 32 (59,26 %) mulheres e 22 (40,74 %) homens. A idade média foi de 35,8 anos, com desvio padrão de $\pm 16,1$ anos. Todas as amostras eram em fase aguda da infecção (até o sétimo dia após o início dos sintomas) e sem sinais de alarme para dengue.

Para a confirmação de dengue, as 54 amostras positivas foram submetidas a testes realizados no ICC Fiocruz de Curitiba. Os resultados mostraram que 38 (70,37 %) do total de amostras foram positivas para NS1.

Para ELISA IgM 21 (38,88 %) amostras foram positivas, com duas amostras com resultado indeterminado. Para IgG foram 13 (24,07 %) amostras, com uma indeterminada.

O isolamento viral foi realizado em 45 (83,33 %) amostras, as quais foram submetidas ao teste de RT-PCR sendo 19 (42,22 %) positivas para DENV-1.

De posse de todas as amostras, foi realizado ELISA indireto contra o peptídeo E₂₅₃₋₂₇₀ na busca por anticorpos específicos da classe IgG, conforme detalhado no item 3.10.

Os resultados obtidos dos valores da absorbância de uma leitura cinética de 30 minutos, DO 450 nm, foram aplicados na fórmula da área sob a curva (ASC). A partir disso, um único valor de leitura cinética de 30 minutos foi gerado. Os dados apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk, $W = 0,977$, $p = 0,157$) e variâncias homogêneas (Teste de Bartlett, $K^2 = 1,369$, $df = 1$, $p = 0,241$), permitindo assim que um Teste T de Student para variâncias iguais fosse utilizado.

Os grupos testados, doadores saudáveis e positivos para DV diferiram entre si em relação à média da ASC (Teste T de Student, $t = -2,9722$, $df = 80$, $p = 0,0039$), onde o grupo positivo apresentou média de $11,305 \pm 3,688$, enquanto que o grupo negativo apresentou média $8,899 \pm 3,014$ (Figura 20).

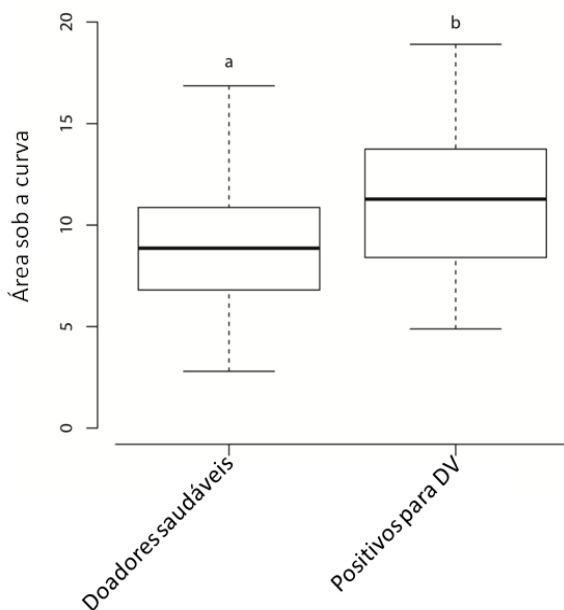


Figura 20. Comparação da área sob a curva dos doadores saudáveis (n = 28) e positivos para DV (n = 54) testados para o peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀. Dados da leitura cinética de 30 minutos gerados através de ELISA indireto contra peptídeo E₂₅₃₋₂₇₀ foram aplicados na fórmula da ASC, sendo obtido um único valor. Os valores gerados de cada amostra testada, doadores saudáveis e positivos para DV foram avaliados através de teste T de Student. Os grupos

diferiram em relação à média da ASC ($t = -2,9722$, $df = 80$ e $p = 0,0039$). O grupo negativo apresentou média $8,899 \pm 3,014$ e o grupo positivo média de $11,305 \pm 3,688$.

4.12 DADOS AVALIADOS UTILIZANDO O CÁLCULO DA ÁREA SOB A CURVA

A partir dos valores da ASC dos dois grupos, foi construída uma curva ROC, a qual sugeriu dois pontos de corte (10,300 e 10,386), para o critério de máxima sensibilidade e especificidade. O ponto de corte de 10,300 teve sensibilidade de 59,2 % e especificidade de 64 %, valor preditivo positivo de 74,4 % e valor preditivo negativo de 45,0 %. O ponto de corte de 10,386 obteve sensibilidade de 59,2 %, especificidade de 64,2 %, valor preditivo positivo de 76,1 % e valor preditivo negativo de 45,0 % (Figura 21).

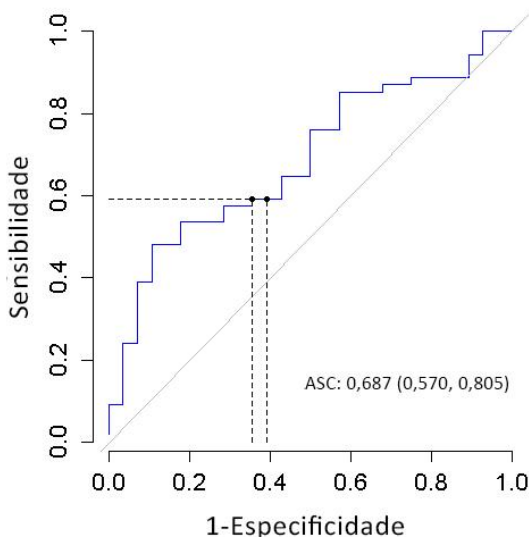


Figura 21. Curva ROC com critério de máxima sensibilidade e especificidade baseado em ensaio de ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG contra E₂₅₀₋₂₇₀. Curva ROC do ELISA indireto apresentou ASC de 0,687. Pontos pretos indicam os pontos de corte sugeridos de 10,300 e 10,386 pela curva ROC. Linhas pontilhadas indicam a localização dos pontos de corte no espaço cartesiano do gráfico.

4.13 DADOS COMPARATIVOS ENTRE AMOSTRAS DE DOADORES SAUDÁVEIS E POSITIVOS PARA DENGUE ATRAVÉS DE ELISA INDIRETO CONTRA $E_{253-270}$

Das 54 amostras positivas para DV, 34 (62,96 %) delas reconheceram o peptídeo. Entre as 28 amostras de doadores saudáveis, 10 (35,71%) ficaram acima do ponto de corte. Entretanto, foi verificado que 12 amostras dos doadores saudáveis haviam sido vacinadas contra a febre amarela, 7 destas amostras reconheceram o peptídeo $E_{250-270}$ (Figura 22). Os dois pontos de corte sugeridos pela curva ROC não diferiram em relação ao número de amostras encontradas acima e abaixo do ponto de corte.

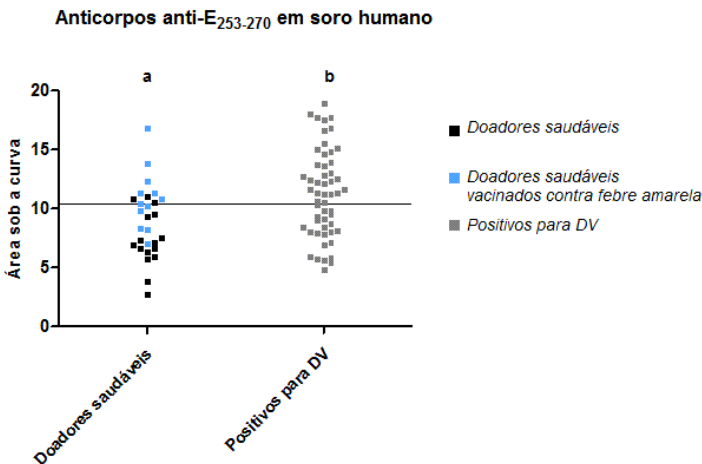


Figura 22. Presença de anticorpos IgG anti - $E_{253-270}$ em amostras de soro coletadas da população. Amostras negativas de 28 voluntários saudáveis de diferentes estados do Brasil e 54 amostras positivas para dengue do município de Cambé - PR foram testadas. Os soros foram diluídos na concentração de 1:100 e os resultados foram obtidos através de leitura cinética de 30 minutos em DO 450 nm. Os dados de cada amostra foram aplicados na fórmula da ASC, e um único valor foi obtido. Linha em preto indica o ponto de corte de 10,386 definido pela curva ROC. O anticorpo secundário utilizado para a detecção de imunoglobulina G foi utilizado na concentração de 1:15.000. Amostras negativas azuis = pacientes vacinados contra febre amarela.

5. DISCUSSÃO

Devido à importância da dengue em todo o mundo, a realização de estudos sorológicos que possam contribuir para diagnósticos e busca de biomarcadores de gravidade ou proteção na doença se mostra essencial.

Estudos de análise de bioinformática do vírus da dengue encontraram uma porção altamente conservada aos quatro sorotipos localizada no domínio II (E-DII) da proteína E, a qual foi denominada peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀ (FLEITH, 2014). Devida a sua conservação, essa estrutura poderia gerar anticorpos, os quais poderiam ter um papel importante na doença. Dessa forma, focamos nosso estudo na busca destes anticorpos.

O peptídeo de interesse, possuía 21 aminoácidos e por ser pequeno, poderia não ter um potencial imunogênico adequado, dessa forma, efetuou-se a clonagem do gene que codifica as proteínas GST e KLH as quais foram fusionadas ao peptídeo de interesse, formando proteínas quiméricas denominadas KLH_E₂₅₃₋₂₇₀ e GST_E₂₅₀₋₂₇₀ para uma maior chance de imunização.

A escolha pela proteína GST deve-se ao fato da mesma ser utilizada em estudos como antígeno para imunização ou estudos de vacinas e por auxiliar na proteção contra proteases intracelulares da bactéria de expressão (BEEKMAN et al., 1994; MAYER et al., 1991; MCTIGUE et al., 1995). A proteína KLH por ter um potencial imunogênico reconhecido, tanto para padrão humoral quanto celular (HARRIS et al., 1999). Ambas as proteínas foram utilizadas como carreadores do peptídeo de interesse, esta estratégia induz uma resposta imunológica melhor por possuir diferentes vetores carreando o mesmo antígeno quando comparada com um só vetor (SALLUSTO et al., 2010).

Uma vez que a proteína GST_E₂₅₀₋₂₇₀ foi expressa em *E. coli* BL21, a primeira purificação foi realizada por cromatografia líquida rápida de proteínas utilizando coluna de níquel, pois o peptídeo possui fusionado à sua porção C-terminal uma cauda de histidina, a qual tem afinidade pelo níquel. Como resultado, bandas entre 25 e 37 kDa foram visualizadas.

Uma vez que a proteína quimérica possui 25 kDa, nós a purificamos novamente, agora em coluna de afinidade por GST, visando apenas a obtenção de banda em 25 kDa, o que não aconteceu.

Na tentativa de resolver o ocorrido, foi realizada uma nova expressão da proteína em bactéria *E. coli* BL21 *códon plus*. Entretanto, mais uma vez foi verificado a presença de bandas próximas a 37 kDa. Após as tentativas possíveis, acreditamos que durante o processo de lise celular bacteriana, porções do citoplasma, não digeridas por proteases da

bactéria permitiram a ligação dessas porções na proteína em estudo, aumentando assim seu peso molecular, como já observado em outros experimentos (AKBARI et al., 2013). Seria interessante a realização de uma espectrometria de massa com a proteína de interesse, para que a medição da massa da GST_E₂₅₀₋₂₇₀ e sua caracterização fossem confirmadas. Para então, utilizá-la na geração de anticorpos contra o peptídeo de interesse.

Na busca por anticorpos monoclonais contra E₂₅₀₋₂₇₀, foram selecionados 11 hibridomas por IFI em células C6/36 infectadas com cepa DENV-1 BR90. Todos eles apresentaram anticorpos contra células não infectadas, indicando reatividade cruzada entre as sequências. Porém, observou-se que o sinal da fluorescência diferiu entre as amostras positivas e o controle negativo. Acreditamos que o método de escolha para a triagem dos clones não foi o mais adequado. Uma triagem por ELISA indireto utilizando o peptídeo E₂₅₃₋₂₇₀ na fase sólida seria mais eficiente e específico.

O ELISA indireto desenvolvido contra o peptídeo E₂₅₃₋₂₇₀ não obteve um controle positivo, pois não foi gerado anticorpo monoclonal, fato o qual foi verificado através dos ensaios de PRNT e ELISA indireto utilizando o sobrenadante dos hibridomas (Figuras 16 e 17).

O aumento no número de PFUs observado no ensaio de PRNT dos sobrenadantes testados indicou o fenômeno da ADE, o que explica o maior número de PFUs encontradas nas diluições 1:10, 1:20 e 1:40.

O reconhecimento do peptídeo E₂₅₃₋₂₇₀ foi verificado em 62,92% das amostras positivas para dengue, resultado esse considerado alto em nosso entendimento, pelo fato de estar inacessível na conformação madura do vírus, sendo exposto somente no momento da fusão viral com a célula hospedeira. Entretanto, é importante ressaltar, que as partículas virais maduras alteram irreversivelmente sua conformação estrutural homogenia por uma conformação irregular em temperaturas acima de 33° C. Essa mudança tem sido considerada uma etapa intermediária ao estado de pré-fusão viral. Estudos recentes têm demonstrado que as partículas virais estão em constante movimento denominado “*breathing*” ou “respiração viral”. Este movimento sugere que epítomos antes inacessíveis possam ser expostos transitariamente, sendo dessa forma possível de serem detectados por anticorpos neutralizantes (ZHANG et al., 2013; PIERSON; KUHN, 2012; FIBRIANSAH et al., 2013) .

A diferença encontrada entre os grupos de doadores saudáveis e positivos para DV do teste de ELISA indireto foi significativa, porém esperávamos uma diferença mais expressiva. Acreditamos que o

ocorrido deveu-se ao fato de no grupo de doadores saudáveis, existirem 12 amostras de pacientes vacinados contra a febre amarela, que também é um *Flavivirus*. Isso pode ser explicado pela similaridade entre as sequências de aminoácidos do peptídeo com a sequência do vírus atenuado da vacina (MAZUMDER et al., 2007). Dentre as dez amostras que ficaram acima do ponto de corte no grupo saudável, sete delas (77,8%) foram vacinadas contra a febre amarela, o que elevou a média da área sobre a curva do grupo de doadores saudável e consequentemente elevou o ponto de corte estipulado.

Houve um predomínio das amostras positivas para o DENV-1 de 42,22 %, fato este que condiz com os dados publicados pela Vigilância Epidemiológica em Saúde, o qual apresenta a prevalência deste sorotipo na região estudada (BRASIL, 2012c; 201d4; 2015e), entretanto isto não afeta o resultado, pois a sequência do peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀ é bem conservada entre os sorotipos DENV-1, 2 e 3 e parcialmente conservada em DENV-4 (FLEITH, 2014, MAZUMDER et al., 2007).

Em relação aos resultados obtidos através do teste de ELISA indireto, quanto à sensibilidade, especificidade, VPP e VPN ele pode ser considerado um teste regular. Porém, quando avaliamos as amostras analisadas vemos uma discrepância já que para um teste IgG necessitaríamos de coletas com um maior tempo de exposição a doença, fato que não ocorreu. Entretanto, quando comparados com o teste IgG realizado por um kit comercial, no mesmo período (BORDIGNON, 2014) a detecção de IgG para proteínas do envelope viral foi de 24,07 %, enquanto que nosso teste detectou 62,96 %, utilizando uma partícula muito menor, ou seja quase 2,5 vezes mais. Esta diferença observada pode estar indicando que os pacientes positivos para dengue possuíam anticorpos IgG contra o peptídeo E₂₅₃₋₂₇₀, pois o mesmo é similar a outros flavivírus, como zika e febre amarela. É importante salientar, que as amostras positivas para dengue não foram testadas para outros flavivírus.

Rocha et al. (2014) realizaram estudo semelhante utilizando um peptídeo de 14 aminoácidos, também conservado, localizado em E-DII na posição 237-250 da proteína E em amostras ideais. Através de ELISA indireto, pacientes positivos para dengue foram testados na busca de anticorpos IgM e IgG, os quais reconheceram 100 % e 93,75 %, respectivamente. Isto reforça a importância de que novos testes sejam realizados na busca por anticorpos IgM, assim como em pacientes com sinais de alarme.

6. CONCLUSÃO

1. Foi possível expressar as proteínas GST fusionadas ao peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀.
2. Não foi possível obter anticorpos monoclonais anti-peptídeo E₂₅₀₋₂₇₀ através dos métodos realizados.
3. Foi desenvolvido ELISA indireto capaz de detectar anticorpos IgG contra o peptídeo E₂₅₃₋₂₇₀;

REFERÊNCIAS

AKBARI, V. Functional expression of a single-chain antibody fragment against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in *Escherichia coli*. **Society for Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 947-956, mar. 2014.

AVIRUTNAN, P. et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 793-806, mar. 2010.

AVIRUTNAN, P. et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **Journal of Infectious Disease**, v. 193, n. 8 p. 1078–1088, mar. 2006.

BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses - an overview. **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 3, p. 1-21, ago. 2013.

BASHYAM, H. S.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L. Dengue virus – reactive CD8⁺ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. **Journal Immunology**, v. 1, n. 176, p. 2817-2824, mar. 2006.

BEEKMAN, J. M. et al. A rapid one-step method to purify baculovirus-expressed human estrogen receptor to be used in the analysis of the oxytocin promoter. **Gene**, v. 2, n. 146, p. 285-293, set. 1994.

BHAT, V. G. et al. Challenges in the laboratory diagnosis and management of dengue infections. **The Open Microbiology Journal**, v. 9, p. 33-37, jun. 2015.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v.496, p. 504-507, abr. 2013.

_____. **Boletim Epidemiológico Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya, e febre pelo vírus zika**. Brasília. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 46, n. 44, 46ª semana epidemiológica. 2015.

BORDIGNON, J. Dados concedidos pelo Dr. Juliano Bordignon. Paraná. Curitiba, 2014.

BLACK, W. C. et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*, v. 33, n. 4, p.379-388, jul. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. 2012. Disponível em: <
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/23/BE-2012-43--1--pag-11-a-15-Dengue.pdf>> Acesso em: 5 fev. 2015

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. 2014. Disponível em:<
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/02/2014-039---Dengue-SE-47.pdf>> Acesso em: 5 fev. 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. 2015. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/07/2015-svs-be-pncd-se48.pdf> Acesso em: 22 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2014. Disponível em: <
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/Dengue-at---2014.pdf>>. Acesso em: 22 dez. 2015.

BUKOWSKI, J. F. et al. Dengue virus-specific cross-reactive CD8⁺ human cytotoxic T lymphocytes. **Journal of virology**, v. 63, n. 12, p. 5086-5091, dez. 1989.

BURKE, G. A.; KEENAN, A. K. Modulation of human endothelial cell permeability by combinations of the cytokines interleukin-1a/b, tumor necrosis factor-a and interferon-gama. **Immunopharmacology**, v. 25, p. 1-9, jun. 1993.

CARRINGTON, L. B., SIMMONS, C. P. Human to mosquito transmission of dengue virus. **Frontiers in Immunology**, v. 17, n.5, p. 290, jun. 2014.

CHAN, K. R. Ligation of Fc gamma receptor IIB inhibits antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 108, n. 30, p. 12479-12484, jul. 2011.

CHRISTIAN, E. A et al. Atomic-level functional model of dengue virus Envelope protein infectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 46, p. 18662–18667, 12 nov. 2013.

CHURDBOONCHART, V. et al. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 481-493, mai. 1991.

DONG, T. et al. High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. **Plos One**, v. 5, n. 1, p. e1192, dez. 2007.

DUSSART, P. et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. **Plos Neglected tropical Diseases**, v. 2, n. 8, p. e280, agos. 2008.

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

FIBRIANSAH, G. et al. Structural Changes in Dengue Virus When Exposed to a Temperature of 37° C. **Journal of Virology**, v. 87, n. 13, p. 7585–7592, jul. 2013.

FLEITH, R. C. **Implicações do peptídeo conservado E₂₅₀₋₂₇₀ da proteína “E” na infectividade do vírus da dengue.** 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2014.

FRIBERG, H. et al. Memory CD8⁺ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection, are highly cross-reactive. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 1, p. 122-129, abr. 2011.

GREEN, A. M. et al. Innate Immunity to Dengue Virus Infection and Subversion of Antiviral Responses. **National Institutes of Health**, v. 426, n. 6, p. 1148-1160, mar. 2013.

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

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever; its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. **In Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. 1997. p.1-22.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 2, fev. 2002.

GUBLER, D. J. et al. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. 2 ed. Boston: Cabi, 2014.

HARRIS, J. R.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. **Micron**, v. 30, n. 6, p. 597-623, abr. 1999.

HOLMES, E. C.; TWIDDY S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p.19-28, dez. 2002.

JESSIE, K., et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Journal of Infectious disease**, v. 189, n. 8, p. 1411–1418, abr. 2004.

KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

KUNO, G. et al. Study of Anti-Dengue NS1 Antibody by Western Blot. **Journal of Medical Virology**, v.32, p.102-108, jun. 1990.

KURANE, B. J.; MADY, B. J.; ENNIS, F. A. Antibody-dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. **Medical Virology reviews**, v. 1, p. 211-221, jun. 1991.

KURANE, I., ENNIS, F. Immunopathogenesis of dengue virus infections. In: Gubler DJ, Kuno G (eds). **Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever**. CAB International: Oxford, 1997, pp 273–290.

KURANE, I.; MEAGER, A; ENNIS, F. A. Dengue virus-specific human T cell clones. Serotype crossreactive proliferation, interferon gamma production, and cytotoxic activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 1, n. 170, p. 763-775, set. 1989.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global Spread and Persistence of Dengue. **Microbiology reviews**, v. 62, p. 71-92, out. 2008.

LOK, S. M. et al. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 3, p. 312-317, mar. 2008.

LOPEZ, M. R. et al. Optimal Cutpoints: An R Package for Selecting Optimal Cutpoints in Diagnostic Tests. **Journal of Statistical Software**, v. 61, n. 8, p. 1-36, out. 2014.

MANGADA, M. M.; ROTHMAN, A. L. Altered cytokine responses of dengue – specific CD4⁺ T cells to heterologous serotypes. **Journal Immunology**, v. 15, n. 175, p. 2676-2683, ago. 2005.

MAREZA, Vania Maria. **Avaliação em camundongos da capacidade imunogênica e da atividade neutralizante *in vitro* dos anticorpos induzidos pela imunização por um candidato vacinal contra dengue, constituído por partículas quiméricas do vírus Junin e peptídeos conservados do vírus da dengue.** 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2015.

MAZUMDER, R. et al. Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. **Virus Genes**, v. 35, n. 2, p. 175-186, mai. 2007.

McTIGUE, M. A. et al. Crystal Structures of a Schistosomal Drug and Vaccine Target: Glutathione S-Transferase from *Schistosoma japonica* and its Complex with the Leading Antischistosomal Drug Praziquantel. **Journal of Molecular Biology**, v. 10, n. 246, p. 21-27, feb. 1995.

MESSINA, J.P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Cell reviews**, v. 22, n. 3, p. 138-146, mar. 2014.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A Structural perspective of the *Flavivirus* life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, p. 14-22, jan. 2005.

OLÁN, L. L. et al. Analysis of Antibody Response in Human Dengue Patients from the Mexican Coast Using Recombinant Antigens. **Vecor Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 1, p. 69-80, fev. 2008.

PAHO. **Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas.** Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=32498&Itemid=270> Acesso em: 22 dez. 2015.

PEELING, R. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, p. 30-38, dez. 2010.

PIERSON, T. C. et al. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. **Cell Host Microbe**, v. 1, n. 2, p. 135-145, abr. 2007.

PIERSON, T.; KUHN, R. Capturing a Virus while It Catches Its Breath. **Structure**, v. 8, n. 20, p. 200-202, fev. 2012.

R Development Core Team 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org>> Acesso em: 16 dez. 2015.

ROCHA, R. P. et al. Evaluation of tetravalent and conserved synthetic peptides vaccines derived from Dengue virus Envelope domain I and II. **Virus Research**, v. 188, p. 122-127, abr. 2014.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p.946-951, abr. 2004.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and cytokine storms. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532-543, ago. 2011.

ROTHMAN, A.L. **Dengue Book**. 1. ed. New York: Springer, 2010.

RUTTEN, B. et al. Increased Platelet Reactivity Is Associated with Circulating Platelet-Monocyte Complexes and Macrophages in Human Atherosclerotic Plaques. **Plos One**, v. 9, n. 8, p.e105019, ago. 2014.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 1, n. 1, p. 30–50, jan. 1952.

SALLUSTO, F. et al. From vaccines to memory and back. **Cell press. Immunity review**, v. 33, p. 451-463, out. 2010.

SANTA CATARINA (Estado). Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Boletim sobre situação da dengue, febre de chikungunya e febre do zika vírus em Santa Catarina. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br/index.php/arquivo-noticias/248-boletim-sobre-situacao-da-dengue-febre-de-chikungunya-e-febre-do-zika-virus-em-santa-catarina-atualizado-em-16-12-2015>> Acesso em: 22 dez. 2015.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature reviews**, v. 15, p. 745-759, dez. 2015.

SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423-1432, abr. 2012.

THULLIER, P. et al. Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. **The Journal of general virology**, v. 82, n. 8, p. 1885–92, ago. 2001.

VOGT, M. R. et al. Human Monoclonal Antibodies against West Nile Virus Induced by Natural Infection Neutralize at a Postattachment Step. **Journal of Virology**, v. 83, n.13, p. 6494-6507, abr. 2009.

WAHALA, W. M.; SILVA, A. M. The human antibody response to dengue virus infection. **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 2374-2395, dez. 2011.

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

WHITEHORNA, J. B.; SIMMONS, C. P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7221-7228, set. 2011.

WHO. **Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses**, 2009.

WHO/TDR. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2 ed. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2007. p. 84

WHO/TDR. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. New editio ed. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2009. p. 147

YACOUB, S. B.; MONGKOLSAPAYAA, J. C.; SCREATON, G. The pathogenesis of dengue. **Vaccine reviews**, v. 26, n. 3, p. 7221-7228, jun. 2013.

ZHANG, X. et al. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. 6795-6799, fev. 2013.

ANEXO A - Tabela com dados informativos dos pacientes positivos para Dengue, cedidas por BORDIGNON (2014), com modificações.

Onde: N = Número de pacientes; ID = número de identificação de cada paciente; D_Infec = Número de dias de infecção; Isol.Viral = Isolamento Viral; IFI = Imunoflorescência indireta; Lanciotti = RT-PCR; E₂₅₀₋₂₇₀ = presença do anticorpo contra E₂₅₀₋₂₇₀; neg = negativo; pos = positivo; ind = indeterminado; Fem = feminino; Masc = masculino; NA = não disponível e SSA = sem sinais de alarme; 2^a Inf. = 2^a infecção por dengue.

N	ID	ELISA NSI	ELISA IgM	ELISA IgG	Idade	Género	D. Infec	Isol. Viral	IFI	Lancifanti	Sorotipo	E:25-270	Critério	2º Inf.
1	LKV/12 147	neg	pos	neg	16	Fem	5	pos	neg	NA	NA	N	SSA	NA
2	LKV/12 150	neg	pos	neg	51	Fem	4	pos	neg	NA	NA	N	SSA	NA
3	LKV/12 179	neg	pos	pos	26	Fem	3	pos	neg	NA	NA	N	SSA	NA
4	LKV/13 341	pos	neg	neg	29	Fem	4	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
5	LKV/13 350	pos	neg	neg	40	Fem	2	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
6	LKV/13 369	pos	neg	neg	23	Masc	2	pos	pos	pos	DENV1	N	SSA	NA
7	LKV/13 374	pos	neg	pos	51	Masc	4	pos	pos	pos	DENV1	N	SSA	NA
8	LKV/13 375	pos	pos	ind	24	Fem	5	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	S
9	LKV/13 381	neg	ind	pos	17	Masc	3	NA	NA	NA	NA	S	SSA	NA
10	LKV/13 400	pos	neg	neg	55	Fem	4	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
11	LKV/13 402	pos	neg	neg	33	Fem	2	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
12	LKV/13 409	neg	pos	pos	47	Fem	2	NA	NA	NA	NA	S	SSA	NA
13	LKV/13 412	pos	neg	neg	50	Masc	4	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
14	LKV/13 494	pos	neg	pos	32	Fem	1	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
15	LKV/13 496	pos	neg	neg	37	Masc	2	pos	NA	neg	NA	S	SSA	NA
16	LKV/13 503	pos	neg	neg	29	Masc	2	pos	pos	pos	DENV1	N	SSA	NA
17	LKV/13 522	pos	neg	neg	42	Fem	2	pos	pos	pos	DENV1	N	SSA	NA
18	LKV/13 524	pos	neg	neg	20	Masc	2	NA	NA	NA	NA	S	SSA	NA
19	LKV/13 535	neg	pos	neg	21	Fem	2	NA	NA	NA	NA	S	SSA	NA
20	LKV/13 542	pos	neg	neg	31	Fem	1	NA	NA	NA	NA	N	SSA	NA
21	LKV/13 548	pos	neg	neg	28	Masc	3	NA	NA	NA	NA	N	SSA	NA
22	LKV/14 587	neg	pos	neg	66	Fem	5	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
23	LKV/14 592	pos	neg	neg	44	Fem	1	pos	neg	NA	NA	S	SSA	NA
24	LKV/14 593	pos	pos	neg	68	Masc	4	pos	pos	pos	DENV1	N	SSA	NA
25	LKV/14 594	pos	pos	pos	30	Fem	5	pos	neg	NA	NA	S	SSA	NA
26	LKV/14 595	neg	pos	neg	18	Fem	2	pos	neg	NA	NA	S	SSA	NA

N	ID	ELISA NSI	ELISA IgM	ELISA IgG	Idade	Gênero	D. Infec	Inol. Viral	IFI	Lanciotri	Sorotipo	E:253-270	Critério	2º Inf.
27	LRV/14 596	pos	neg	neg	33	Fem	3	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
28	LRV/14 598	neg	pos	neg	38	Fem	4	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
29	LRV/14 599	pos	neg	pos	23	Fem	2	pos	neg	NA	NA	S	SSA	NA
30	LRV/14 600	neg	pos	neg	19	Másc	1	pos	neg	NA	NA	N	SSA	NA
31	LRV/14 601	pos	neg	neg	8	Fem	2	pos	pos	NA	NA	S	SSA	NA
32	LRV/14 602	neg	pos	neg	57	Fem	2	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
33	LRV/14 603	pos	neg	neg	4	Fem	2	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
34	LRV/14 608	pos	pos	neg	30	Másc	4	NA	NA	NA	NA	S	SSA	NA
35	LRV/14 611	pos	neg	neg	43	Másc	2	NA	NA	NA	NA	S	SSA	NA
36	LRV/14 612	pos	neg	neg	61	Fem	4	NA	NA	NA	NA	N	SSA	NA
37	LRV/14 620	pos	neg	neg	20	Másc	6	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
38	LRV/14 623	pos	neg	neg	25	Másc	3	pos	pos	pos	DENV1	S	SSA	NA
39	LRV/14 768	pos	neg	neg	62	Fem	5	pos	pos	NA	NA	N	SSA	NA
40	LRV/14 777	pos	neg	pos	42	Fem	4	pos	pos	pos	NA	N	SSA	NA
41	LRV/14 778	pos	neg	neg	44	Másc	3	pos	pos	NA	NA	N	SSA	NA
42	LRV/14 782	neg	pos	neg	68	Fem	3	pos	neg	NA	NA	N	SSA	NA
43	LRV/14 783	neg	pos	neg	28	Másc	3	pos	pos	NA	NA	N	SSA	NA
44	LRV/14 786	pos	neg	pos	46	Másc	3	pos	pos	NA	NA	N	SSA	NA
45	LRV/14 787	neg	ind	pos	46	Fem	2	pos	neg	NA	NA	N	SSA	NA
46	LRV/14 789	pos	neg	neg	54	Fem	2	pos	pos	NA	NA	N	SSA	NA
47	LRV/14 790	pos	neg	neg	21	Másc	3	pos	pos	NA	NA	N	SSA	NA
48	LRV/14 791	pos	pos	pos	58	Fem	4	pos	pos	NA	NA	S	SSA	NA
49	LRV/14 796	pos	pos	neg	58	Másc	4	pos	neg	NA	NA	S	SSA	NA
50	LRV/14 797	pos	pos	pos	18	Fem	5	pos	neg	NA	NA	S	SSA	NA
51	LRV/14 798	pos	neg	neg	39	Másc	7	pos	pos	NA	NA	S	SSA	NA
52	LRV/14 800	pos	neg	pos	17	Fem	NA	pos	pos	NA	NA	S	SSA	NA
53	LRV/14 801	neg	pos	neg	28	Másc	3	pos	neg	NA	NA	S	SSA	S
54	LRV/14 804	neg	pos	neg	19	Másc	3	pos	neg	NA	NA	S	SSA	NA

