



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA- PPGBIOTEC

UTILIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS QUIMÉRICOS DAS PROTEÍNAS
DE ENVELOPE (E), NÃO ESTRUTURAL 1(NS1) E NÃO
ESTRUTURAL 3 (NS3) PARA PRODUÇÃO DE INSUMOS
DIAGNÓSTICOS DA DENGUE

KATIÚSCIA ALEXANDRE RIOS

PORTO VELHO - RO
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

KATIÚSCIA ALEXANDRE RIOS

UTILIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS QUIMÉRICOS DAS PROTEÍNAS
DE ENVELOPE (E), NÃO ESTRUTURAL 1(NS1) E NÃO
ESTRUTURAL 3 (NS3) PARA PRODUÇÃO DE INSUMOS
DIAGNÓSTICOS DA DENGUE

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas como requisito para Obtenção do Título
de Doutor em Biotecnologia, área de concentração
Biotecnologia para Saúde.

Orientador: Prof^o. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da
Silva

Co-orientador: Prof^o. Dr. Eduardo Rezende Honda

PORTO VELHO - RO
2014

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Rios, Katiúscia Alexandre

R586c Utilização de peptídeos quiméricos das proteínas de envelope (E) ,
não estrutural 1 (NS1) e não estrutural 3 (NS3) para produção de
insumos diagnósticos da dengue / Katiúscia Alexandre Rios. –
Manaus, 2014.

105f. il. color.

Tese (doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
Amazonas.

Orientador: Profº. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva

Co-orientador: Profº. Dr. Eduardo Rezende Honda

1. Dengue 2. Peptídeos 3. Biomoléculas 4. Proteínas I Silva, Luiz
Hildebrando Pereira (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas
III. Título

CDU 2007 577.112.6(043.2)

KATIÚSCIA ALEXANDRE RIOS

UTILIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS QUIMÉRICOS DAS PROTEÍNAS
DE ENVELOPE (E), NÃO ESTRUTURAL 1 (NS1) E NÃO
ESTRUTURAL 3 (NS3) PARA PRODUÇÃO DE INSUMOS
DIAGNÓSTICOS DA DENGUE

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas como requisito parcial para Obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia, área de
concentração Biotecnologia para Saúde.

Orientador: Prof^o. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da
Silva

Co-orientador: Prof^o. Dr. Eduardo Rezende Honda

Aprovado em 27 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Dr. Eduardo Rezende Honda
Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEN

Dr. Spartaco Astolfi Filho
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dr. Fernando Berton Zanchi
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Dr. Cesarino Junior Lima Aprígio
Agência Estadual de Vigilância Sanitária - AGEVISA

Dr. Fabrício Calvo
Faculdade São Lucas - FSL

Aos meus pais, Rios e Elizabeth, por tudo
que me proporcionaram e por nortear
minha educação.

Ao Eduardo, pelo apoio incondicional para
eu finalizar mais esse projeto de vida.

À Maria Eduarda, meu maior tesouro, por
me proporcionar tantas alegrias.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. **Luiz Hildebrando Pereira da Silva**, pela orientação e apoio no decorrer deste trabalho;

Ao Professor **Spartaco Astolfi Filho** pelo seu carinho, atenção e valiosos ensinamentos;

Ao **Fernando Berton Zanchi** e **Sérgio Oliveira de Paula** pelo apoio e contribuições ao logo deste trabalho;

Aos meus grandes amigos **André Bodinhon**, **Eleonora Andrade**, **Elis Regina Alves** e **Eulina Nogueira** pelo apoio, incentivo, divertidos e inesquecíveis momentos que passamos juntos;

Às minhas amigas **Silane Caminha** e **Otilene Santos** com as quais aprendi muitos valores e, sempre companheiras, me apoiaram ao longo de várias etapas de minha vida estudantil;

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM pela formação acadêmica e científica, em especial ao professor **José Odair Pereira**;

Ao CNPq pelo fornecimento de um ano de bolsa estudo.

À todos muito obrigada!

Mudam-se os Tempos, Mudam-se as Vontades

Muda-se o ser, muda-se a confiança:
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades.

Continuamente vemos novidades,
Diferentes em tudo da esperança:
Do mal ficam as mágoas na lembrança,
E do bem (se algum houve) as saudades.

O tempo cobre o chão de verde manto,
Que já coberto foi de neve fria,
E em mim converte em choro o doce canto.

E afora este mudar-se cada dia,
Outra mudança faz de mor espanto,
Que não se muda já como soía.

Luís Vaz de Camões, in "Sonetos"

RESUMO

A infecção pelo vírus dengue continua sendo um grande problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo a principal doença viral transmitida por artrópodes, com alta morbidade e mortalidade. O diagnóstico clínico da dengue requer confirmação laboratorial devido à semelhança dos sintomas com uma série de outras febres agudas e para detecção de infecções virais primárias ou secundárias. O desenvolvimento de testes baratos, sensíveis, específicos e de fácil execução, que sejam capazes de proporcionar diagnóstico precoce da infecção pelo vírus da dengue, é ainda uma necessidade. Neste trabalho mapeamos, por ferramentas de bioinformática, peptídeos das proteínas de Envelope (E), Não Estrutural 1 e 2 que apresentasse como características: elevada antigenicidade, hidrofobicidade e probabilidade de se apresentar na superfície. O primeiro peptídeo, com peso molecular de 17KDa, foi denominado E/ENS3 e corresponde a duas sequências da proteína de Envelope (E) e uma sequência da Não Estrutural 3. O segundo peptídeo, com peso molecular de 15Kda, foi denominado ENS1/3 e corresponde a uma sequência da proteína de Envelope (E), uma sequência da Não Estrutural 1 e uma sequência da Não Estrutural 3. Os peptídeos foram expressos em sistemas em sistema procarioto, purificados e utilizados em teste de ELISA (*Enzyme-Linked Assay Imunoabsorvente*). Foram realizadas a detecção de anticorpos IgM e IgG de amostras de laboratório, previamente caracterizadas, através de ELISA Indireto e obteve-se os seguintes resultados: (1) na pesquisa de IgG usando os peptídeos E/ENS3 e ENS1/3, a sensibilidade foi de 65% e a especificidade foi de 91,7% e (2) na pesquisa de IgM a sensibilidade foi de 75,7% e especificidade foi de 91,8%. Estes resultados indicam que a utilização dos peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 podem ser uma alternativa para o diagnóstico sorológico da dengue.

Palavras-Chaves: Dengue, Diagnóstico e Peptídeos.

ABSTRACT

Dengue infection has become a public health problem in tropical and sub-tropical areas. It is a viral disease transmitted by arthropods with high mortality rates. Its clinical diagnosis requires laboratory confirmation because several other conditions can also cause similar symptoms with acute fevers as well as the primary use antibodies or antigens for detection of DENV. The continued development of diagnostic tests that are cheap, sensitive, specific, easy to perform, and that are capable of giving early diagnosis of the dengue virus infection is still a needed. Using bioinformatics, we mapped peptides of Envelope protein (E), Nonstructural 1 and 2 which have antigenicity, hidrofility and probality to apper on the surface. The first peptide, with molecular weight of the 17KDa, was called E/ENS3 and corresponds to two Envelope protein (E) sequences and a Nonstructural 3 sequence. The second peptide, with molecular weight of the 15Kda, was called ENS1/3 and it corresponds to a Envelope protein (E) sequence, a Nonstructural 1 sequence and Nonstructural 3 sequence. The peptides were expressed in prokaryotic sistem, purified and used in ELISA (*Enzyme-Linked Assay Imunoabsorvente*). Using Indirect ELISA in the IgM and IgG antibody detection previously characterized, we obtained as results: (1) IgG research using E/ENS3 and ENS1/3 peptides, sensibility was 65% and the specificity was 91,7% and (2) IgM research, sensibility was 75,7% and and the specificity was 91,8%. These results indicate that use of both E/ENS3 and ENS1/3 peptides may be a alternative to the serological diagnosis of dengue.

Key-words: Dengue, Diagnosis and Peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Organização esquemática do genoma do vírus dengue (DENV)	22
Figura 02	Organização esquemática da poliproteína do DENV	23
Figura 03	Representação esquemática do homodímero da Glicoproteína E do DENV	26
Figura 04	Ciclo do DENV	32
Figura 05	Representação esquemática dos níveis de anticorpos específicos anti-dengue IgM (vermelho) e IgG (laranja), níveis do antígeno NS1 (roxo) e viremia durante infecção primária e secundária	34
Figura 06	Esquema da técnica do ELISA de indireto e ELISA de Captura	40
Figura 07	Sorotipos de dengue identificados por UF, Brasil, 2012	44
Figura 08	Representação esquemática de vetor de expressão procarioto pRSET A (Invitrogen- New York-USA) utilizados para expressão dos peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 recombinantes	57
Figura 09	Curva padrão de BSA 1mg/mL utilizada para quantificação das proteínas E/ENS3 e ENS1/3 ($R^2 = 0,9942$)	60
Figura 10	Análises das sequências lineares das proteínas E (A), NS1 (B) e NS3 (C)	66
Figura 11	Esquema do vetor de clonagem pUC 57 com local da inserção do fragmento nucleotídeo codificante para o peptídeo EE/NS3 (426 pb)	69
Figura 12	Esquema do vetor de clonagem pUC 57 com local da inserção do fragmento nucleotídeo codificante para o peptídeo ENS1/3 (327pb)	69
Figura 13	Análise da digestão dos plasmídeos recombinantes pUC 57 E/ENS3 (A) e pUC E/ENS1/3 (B).	70
Figura 14	Análise dos peptídeos ENS1/3 e E/ENS3 por <i>Western blotting</i> .	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Casos, Incidência, Casos Graves e óbitos por Casos Graves de Dengue no Brasil, de 2003 -2012	46
Tabela 02	Casos, Incidência, Casos Graves e óbitos por Casos Graves de Dengue em Rondônia, de 2003 -2012	46
Tabela 03	Localização, número e sequência de aa dos peptídeos das proteínas de Envelope (E) e Não estrutural 3 (NS3) do peptídeo denominado E/ENS3	67
Tabela 04	Localização, número e sequência de aa dos peptídeos das proteína de Envelope (E), Não estrutural 1 (NS1) e Não estrutural 3 (NS3) do peptídeo denominado ENS1/3	67
Tabela 05	Sequências dos genes quiméricos EENS3 e ENS1/3 otimizadas para expressão em procariotos	68
Tabela 06	Resultados do ELISA Indireto para captura de IgG	74
Tabela 07	Resultados do ELISA Indireto para captura de IgM.	74
Tabela 08	Resultado das análises estatísticas, utilizando o programa Microsoft Excel 2010, de sensibilidade, especificidade, probabilidade pré-teste, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para pesquisa de anticorpos da classe IgG utilizando os peptídeos E/ENS3 e EENS1/3 do total de 363 amostras, sendo 223 positivas e 130 negativas.	75
Tabela 09	Resultado das análises estatísticas, utilizando o programa Microsoft Excel 2010, de sensibilidade, especificidade, probabilidade pré-teste, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para de anticorpos da classe IgM utilizando os peptídeos E/ENS3 e EENS1/3 do total de 357 amostras controles, sendo 235 positivas e 122 negativas.	75

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01** Distribuição das leituras (DO) dos controles positivos (○) e negativos (□), absorvâncias em 405 nm obtidas por espectrometria, utilizando o peptídeo E/ENS3 e ENS1/3 como antígeno para pesquisas de anticorpos anti-dengue IgG por ELISA. Cut Off: 0,5080. 73
- Gráfico 02** Distribuição das leituras (DO) dos controles positivos (○) e negativos (□), absorvâncias em 405 nm obtidas por espectrometria, utilizando o peptídeo E/ENS3 e ENS1/3 como antígeno para pesquisas de anticorpos anti-dengue IgM por ELISA. Cut Off: 0,290. 73

SUMÁRIO

	Lista de Figuras	vii
	Lista de Tabelas	viii
	Lista de Gráficos	ix
1	INTRODUÇÃO	14
1.1	A Dengue	17
1.2	Febre hemorrágica do dengue (FHD) e Síndrome do Choque do Dengue (SCD)	19
1.3	O Vírus Dengue	21
1.4	Proteínas do DENV	23
1.4.1	Proteínas Estruturais	24
1.4.2	Proteínas Não Estruturais	27
1.5	Ciclo do DENV	31
1.6	Diagnósticos Laboratoriais da Dengue	33
1.6.1	Isolamento Viral	34
1.6.2	Detecção do Genoma Viral	35
1.6.3	Diagnóstico Sorológico	36
1.6.3.1	Inibição de Hemaglutinação (IH)	37
1.6.3.2	Reação de Fixação do Complemento	37
1.6.3.3	Teste de Neutralização por Redução de Placa	37
1.6.3.4	ELISA	38
1.6.4	Detecção de antígeno	40
1.7	Epidemiologia do Dengue	41
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo Geral	48
2.2	Objetivos Específicos	48

3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	Amostras Biológicas	50
3.2	Sequências Genômicas dos Vírus Dengue Utilizadas nos Alinhamentos e Definição das Sequências dos Peptídeos	50
3.3	Mapeamento dos Peptídeos da Proteína de Envelope (E) e Não Estrutural 1 (NS3) e Não Estrutural 3 (NS3)	51
3.4	Síntese Química dos Fragmentos Gênicos Codificantes para os Peptídeos E/ENS3 e ENS1/3	52
3.5	Preparo de Células Quimiocompetentes <i>TOP10F'</i> (Invitrogen-USA) e BL - 21 <i>SoluBL21</i> [™] (Genlantis - USA)	52
3.6	Extração do DNA Plasmidial (Miniprep) dos Clones pUC 57 E/ENS3 e ENS1/3	53
3.7	Análise do DNA Plasmidial através de Enzimas de Restrição <i>Bam HI</i> e <i>Eco RI</i> (Invitrogen® - USA)	54
3.8	Análise Eletroforética dos Produtos de Digestão do Vetor de Clonagem pUC 57 com Enzimas de Restrição <i>Bam HI</i> e <i>Eco RI</i>	54
3.9	Purificação dos Fragmentos Utilizando “ <i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> ” (Quiagen®)	55
3.10	Ligação dos Fragmentos Gênicos E/ENS3 e ENS1/3 em Vetor de Expressão pRSET A (Invitrogen- New York-USA)	56
3.11	Expressão dos Fragmentos Gênicos E/ENS3 e ENS1/3 em Vetor Procarioto pRSET A (Invitrogen- New York-USA)	56
3.12	Expressão dos plasmídeos pRSETAE/ENS3 (427 pb), pRSETAENS1/3 e Visualização por SDS-PAGE	58
3.13	Purificação dos Peptídeos <i>E/ENS3 (17 kDa)</i> e <i>ENS1/3 (15 kDa)</i> e <i>Western Blott</i>	58
3.14	Imunoblot	59
3.15	Quantificação das Proteínas E/ENS3 (17 kDa) e ENS1/3 (15 kDa) - Método de Bradford	60
3.16	Utilização dos Peptídeos E/ENS3 (17 kDa) e ENS1/3(15 kDa) em ELISA (<i>Enzyme-LinkedImmunoabsorbentAssay</i>) Indireto	61
3.17	Cálculos Estatísticos	62

3.18	Aspectos Éticos	62
4	RESULTADOS	63
4.1	Resultados das Análises de Bioinformática	64
4.1.1	Definição das Sequências Lineares de aa das Proteínas de Envelope (E) e Não Estrutural 3 (NS3) e Não estrutural 1 (NS1) do DENV para Seleção dos Peptídeos E/ENS3 e ENS1/3	64
4.1.2	Sequências Lineares de Aminoácidos da Proteína E, Não Estrutural 3 (NS3) e 1 (NS1) dos Peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 do DENV	65
4.2	Sequências Quiméricas dos Genes Codificantes <i>E/ENS3</i> (426 pb) e <i>ENS1/3</i> (327 pb)	68
4.3	Digestão com <i>Bam HI</i> e <i>Eco RI</i> dos Plasmídeos pUCENS3 e pUCENS1/3	70
4.4	Utilização dos peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 como antígenos em teste de ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>) indireto	71
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÕES	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

I- INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A combinação de vários fatores estruturais e conjunturais favorece a expansão e a manutenção da circulação do vírus dengue (DENV) em seus vetores. Entre os fatores associados à emergência da febre do dengue (DF) e febre hemorrágica do dengue (FHD) nos países em desenvolvimento, como países das Américas, estão o acelerado crescimento e urbanização populacional, associado à insuficiência no controle do vetor e ao aumento do trânsito de pessoas entre os países. O saneamento básico, particularmente o abastecimento de água e a coleta de lixo, mostra-se insuficiente ou inadequado nas periferias das grandes metrópoles. Associado a esta situação, o sistema produtivo industrial moderno, produz uma grande quantidade de recipientes descartáveis com destinos inadequados após o uso (GUGLER e CLARK, 1996; TAUIL, 2001).

Vários estudos promissores de uma vacina contra o dengue têm sido realizados, inclusive no Brasil (SCHMITZ et al, 2011; GUY et al, 2011, DURHAM, et al, 2013), algumas vacinas candidatas encontram-se em vários estágios de desenvolvimento no entanto ainda não se dispõe de uma vacina aprovada para uso na população. Mesmo com a aprovação de uma vacina em alguns anos, outras medidas de controle do DENV devem continuar em associação à vacina, para que a dengue seja efetivamente combatida. O atual método de controle tem sido a prevenção na exposição e o combate aos mosquitos vetores mediante a vigilância vetorial e a aplicação de inseticidas, mas este método vem apresentando baixa eficácia e altos custos (TEIXEIRA et al, 1999; TAUIL, 2002; PENNA, 2002). O tratamento recomendado para essa doença é o sintomático e terapia de suporte (WHO, 2009).

O diagnóstico da infecção pelo DENV é baseado, na maioria dos casos, apenas por exame clínico do paciente, já que apenas os grandes centros possuem laboratórios para confirmação dos casos. O diagnóstico laboratorial rápido e eficiente é importante para o

direcionamento dos cuidados clínicos do paciente, vigilância epidemiológica, estudo da patogênese da infecção, pesquisas vacinas, além de contribuir para detecção precoce de focos de epidemia para que sejam feitas a localização e contenção da disseminação da transmissão do vírus em tempo hábil (OLIVEIRA et al., 2011).

A dengue possui amplo espectro clínico, podendo manifestar vários sinais e sintomas, assim, sua rápida distinção entre outras doenças febris, exantemáticas febris e hemorrágicas febris como influenza, rubéola e leptospirose (BRASIL, 2013a), poderiam ajudar a identificar pacientes que devem ser monitorados quanto a sinais da dengue hemorrágica, e consequentemente, tratados adequadamente.

No Brasil já ocorreram várias epidemias relacionadas aos diferentes sorotipos do DENV e a recente presença do DENV-4 no país é motivo de preocupação pela possibilidade de ocorrência de novas epidemias e casos graves, uma vez que grande parte da população possui anticorpos contra pelo menos um dos outros sorotipos do DENV.

Apesar da grande quantidade de recursos investidos no desenvolvimento de vacinas, kits diagnósticos, novas gerações de inseticidas, modelos computacionais de controle da doença em expansão, ainda há a necessidade do desenvolvimento de testes diagnósticos para monitoramento dos casos dessa doença e medidas de controles epidemiológicas que visem à diminuição do número de casos e mortes por essa enfermidade (WHO, 2009; HORSTICK et al., 2010). Deste modo, é imperativo o desenvolvimento de testes diagnósticos para detecção precoce da infecção, que diferencie a infecção pelo DENV da infecção por outros flavivirus, que identifique o sorotipo, que seja sensível, específico e de baixo custo. Outros obstáculos, não especificamente relacionados ao desenvolvimento biotecnológico, como a infra-estrutura dos laboratórios, o treinamento de pessoal técnico e a capacidade de pesquisa ainda são limitados no Brasil e em países onde a dengue é endêmica (OLIVEIRA et al., 2011).

Na tentativa de contribuir com o desenvolvimento continuado de insumos para testes diagnósticos baratos, a presente pesquisa, utilizou-se de antígenos recombinantes como componentes de um teste diagnóstico. Os “kits” comerciais para diagnósticos hoje utilizados no Brasil são importados, apresentam resultados satisfatórios, no entanto, são de alto custo.

1.1 A Dengue

O primeiro relato de epidemia da dengue ocorreu entre 1779 e 1780 em que o vírus e seu vetor tiveram distribuição mundial nos trópicos, atingindo os continentes Asiático, Africano e Norte Americano (GUBLER, 1998).

A febre do dengue é uma doença infecciosa não contagiosa causada pelo vírus dengue (DENV) pertencente a família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, transmitido ao homem pela picada de mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, principalmente o *A. aegypti* e *A. albopictus*, embora tenha sido isolado de outras espécies como *A. polynesiensis* (ROSEN et al., 1954).

O DENV foi isolado pela primeira vez em 1943 durante uma epidemia em Nagasaki, Japão (KIMURA e HOTTA, 1944). Em 1952 foram reconhecidas a existência de diferentes sorotipos e desde então iniciou-se as tentativas de desenvolver uma vacina para doença (HOTTA, 1952; SABIN, 1952).

Os vírus são mantidos em ciclo que envolve o homem e o *A. aegypti*, vetor de hábitos domésticos, que pica durante o dia e tem preferência acentuada por sangue humano (GUBLER e CLARK, 1995). O *A. aegypti* utiliza-se preferencialmente de depósitos de água limpa para deposição dos ovos, os quais têm uma alta capacidade de resistir à dessecação e grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais desfavoráveis (TAUIL, 2002). O ciclo de transmissão que envolve o hospedeiro humano e os vetores do gênero *Aedes*

é denominado ciclo endêmico/epidêmico urbano. O ciclo zoonótico ou selvagem, descrito nas florestas da África e Malásia, envolve primatas não humanos como hospedeiros vertebrados e diferentes mosquitos do gênero *Aedes* (WANG et al., 2000).

A transmissão do DENV ocorre através da picada da fêmea infectada, que ao realizar o repasto sanguíneo pode transmitir o vírus, após um período de incubação extrínseco, que varia de 8 a 10 dias. No indivíduo humano infectado, o vírus passa por um período de incubação intrínseco, variando de 3 a 14 dias até que ocorra o aparecimento dos sintomas. Posteriormente, esses indivíduos se tornam infectantes para o *A. aegypti* nos primeiros dias da doença, ou seja, durante o período de viremia, que geralmente coincide com a ocorrência dos sintomas que dura de 5 a 7 dias (GUBLER, 1998; SENANAYAKE, 2006).

A infecção pelo DENV pode resultar em diversas manifestações clínicas, variando de um quadro assintomático até quadros clássicos de febre do dengue (DF) e febre hemorrágica do dengue (FHD) que pode evoluir para síndrome do choque do dengue (SCD) (WHO, 2009). A DF pode ocorrer em infecções primárias e secundárias sendo caracterizada pelo aparecimento súbito de febre, acompanhada por cefaléia, dor retro-orbitária, artralgia, mialgia, prostração, náuseas, vômitos, exantemas e prurido cutâneo (BRASIL, 2002).

As células alvos iniciais na infecção viral acredita-se ser as células de Langerhans (WU et al., 2000), em seguida, através do sistema linfático, os vírus disseminam para outros tecidos como do fígado, baço, rins e sangue. Os monócitos, macrófagos e células endoteliais são as principais células de replicação do vírus (JESSIE et al., 2004).

Os sintomas gerais da dengue como febre e mal-estar, que surgem após período de incubação coincidindo com a viremia, relacionam-se a níveis séricos elevados de citocinas liberadas por macrófagos ao interagirem com linfócitos T (LT) *helper* ativados. A leucopenia discreta e transitória e a depressão medular que se apresentam nesses casos, também se relacionam aos altos teores de citocinas macrofágicas. As mialgias são consequentes, em

parte, à multiplicação viral no próprio tecido muscular e são acometidos, inclusive músculos oculomotores, sendo responsáveis pela cefaléia retro-orbitária que muitos pacientes apresentam (KURANE e ENNIS, 1992).

A DF e FHD são causadas por um dos quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os sorotipos são antigenicamente distintos, mas intimamente relacionados, apresentando homologia entre sequência genômica de 65 a 70%, e com base na sequência do gene envelope (E), os sorotipos podem ser divididos em grupos filogenéticos diferentes ou genótipos (RICO-HESSE, 1990). A infecção primária com um dos sorotipos gera proteção imunológica à longo prazo para aquele sorotipo e imunidade temporária para os outros (SABIN, 1952).

1.2 Febre hemorrágica do dengue (FHD), Síndrome do Choque do Dengue (SCD) e Dengue com Complicações (DCC)

A FHD é caracterizada por febre alta, manifestações hemorrágicas (evidenciadas especialmente por sinais como prova do laço positiva, petéquias e sangramento de mucosas do trato gastrointestinal), equimoses ou púrpuras e insuficiência circulatória. A principal característica fisiopatológica é o extravasamento de plasma devido aumento da permeabilidade capilar manifestado pela presença de ascite, derrame pleural, hipoproteinemia e hemoconcentração. Pode-se ainda observar trombocitopenia (plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$). Nos casos graves de FHD, o paciente pode entrar em choque hipovolêmico decorrente do aumento da permeabilidade vascular, seguido da hemoconcentração e falência circulatória, Síndrome do Choque do Dengue (SCD), que ocorre entre o terceiro e sétimo dia da doença, podendo levar ao óbito em menos de 24 horas (BRASIL, 2002).

A Dengue com complicações (DCC) são casos que não se enquadram nos critérios de Dengue Clássica e FHD, sendo caracterizada com a presença de uns dos seguintes achados: alterações graves do sistema nervoso, disfunção cardiorrespiratória, insuficiência hepática, plaquetopenia $\geq 20.000/\text{mm}^3$, hemorragia digestiva, derrames cavitários, leucócitos $\leq 1.000/\text{mm}^3$ e caso suspeito da dengue com evolução para óbito, mas sem todos os critérios de encerramento por FHD (BRASIL, 2013a).

Pessoas que vivem em áreas endêmicas podem ter quatro infecções por dengue ao longo da vida, tornando um fator de risco para FHD e SCD. A teoria mais aceita sobre a evolução da DF para FHD trata-se do fenômeno de facilitação da penetração viral por anticorpos em macrófagos, atribuído ao ADE (*Antibody-Dependent Enhancement-ADE*): anticorpos não neutralizantes, contra antígeno E e prM, formam um complexo com o vírus e infectam fagócitos através do receptor Fc (HALSTEAD, 1989; DEJNIRATTISAI et al., 2010; ZELLWEGGER et al., 2010). O resultado global é um aumento da replicação do vírus que está associada com um aumento na gravidade da doença. Um outro fator de risco para o desenvolvimento de formas graves é a infecção com cepas virais mais virulentas. Mutações no genoma do vírus podem aumentar a virulência das cepas de diferentes formas como indução de uma maior competência vetorial, aumento na eficiência de replicação e modulação na resposta imune do hospedeiro à infecção (CLYDE et al., 2006).

Outros fatores também foram atribuídos à maior gravidade da DF com o estado imunológico do paciente, idade, predisposição genética (GUBLER e CLARK, 1995) e lactentes que receberam, intra-útero, anticorpos maternos anti-dengue. Com o passar de meses, tais anticorpos, que apresentam queda gradual, atingem níveis subneutralizantes. No caso de infecção desses lactentes pelo mesmo tipo viral que causou a infecção materna e, na presença dos anticorpos subneutralizantes, ocorreria ADE, e os pacientes desenvolveriam FHD/DSS (KLIKIS et al., 1988).

1.3 O Vírus Dengue

Os vírus Dengue são partículas esféricas, com aproximadamente 50 nm de diâmetro, constituídas por um nucleocapsídeo de 30nm e envolto por um envelope lipídico, no qual estão ancoradas glicoproteínas de superfície (KUHN et al., 2002).

O vírus dengue apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos: sorotipo 1 (DENV-1), sorotipo 2 (DENV-2), sorotipo 3 (DENV-3) e sorotipo 4 (DENV-4), embora recentemente cientistas disseram ter descoberto e caracterizado um novo dengue sorotipo (DENV 5). Tal vírus foi coletado durante um surto na Malásia em 2007 e parece circular em macacos (NORMILE, 2013).

O genoma do DENV é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 11 kilobases (Kb) (Figura 01). Este RNA possui uma única fase de leitura (*Open Reading Frame*, ORF) que traduz uma grande poliproteína (Figura 02) sendo posteriormente clivada, por proteases da célula hospedeira e virais, em três proteínas estruturais (C-capsídeo, prM-pré-membrana, E-envelope) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (ROSS, 2010).

A ORF do genoma do DENV é flanqueada por regiões não codificadoras (UTRs- Untranslated Regions) na extremidade 5'e 3' que possuem elementos estruturais necessários para tradução e replicação viral (YU et al., 2008). A 5'UTR é relativamente curta, cerca de 100 nucleotídeos, com uma estrutura CAP (m7G5'ppp5'A) e dois domínios com funções distintas na síntese do RNA viral. A 3'UTR, com cerca de 450 nucleotídeos, não possui cauda "poly A" podendo ser dividida em três domínios localizados logo após o códon de parada (GEBHARD et al., 2011).

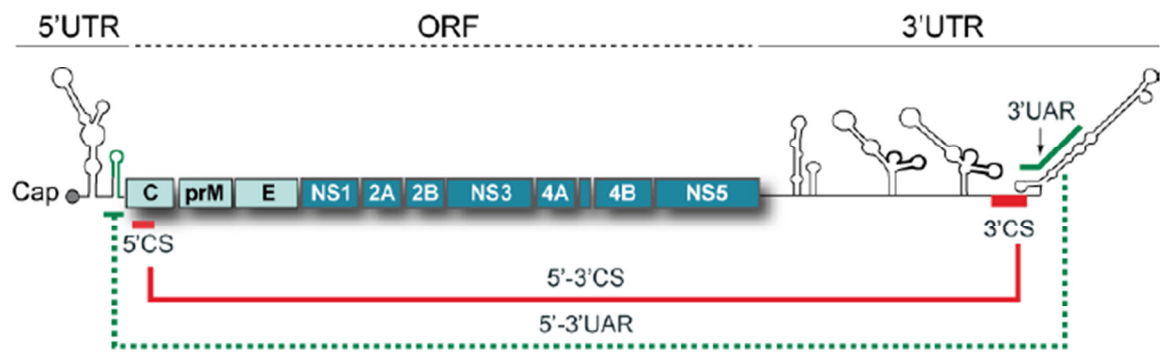


Figura 01- Organização esquemática do genoma do vírus dengue (DENV). O RNA viral possui regiões não traduzidas (*Untranslated Regions*, UTRs) 5' e 3' e uma única fase de leitura (*Open Reading Frame*, ORF) correspondente às proteínas estruturais (C-prM-E, C: proteína de capsídeo, M: membrana e E: envelope) e não estruturais (NS1-NS2AB-NS3-NS4AB-NS5). A localização das sequências complementares 5'-3'CS e 5'-3'UAR estão indicadas com as linhas vermelha e verde respectivamente.

FONTE: Modificada de Gebhard et al., 2011.

O *cap* juntamente com estruturas secundárias presentes na 3'UTR parecem ser responsáveis por conferir estabilidade ao RNA viral, além de desempenharem um papel importante na regulação da síntese de RNA e na expressão das proteínas virais (CHIU et al., 2005). Embora as extremidades não sejam traduzidas, elas apresentam regiões de sequências conservadas (*conserved sequences*, CSs) que parecem desempenhar papéis importantes na replicação viral: 5'CS, 3'CS, 5'UAR, 3'UAR, CS2 e RCS2. A sequência 5'CS, localizada na região que codifica a porção aminoterminal da proteína C, é complementar a 3'CS, situada no 3'UTR e 5'UAR por sua vez é uma 5'UTR, localizada a montante do AUG que codifica o primeiro aminoácido da poliproteína, é complementar a 3'UAR, situada no 3'SL (SL: *stem-loop*) terminal (HAHN et al., 1987; ALVAREZ et al., 2005; VILLORDO e GAMARNIK, 2009).

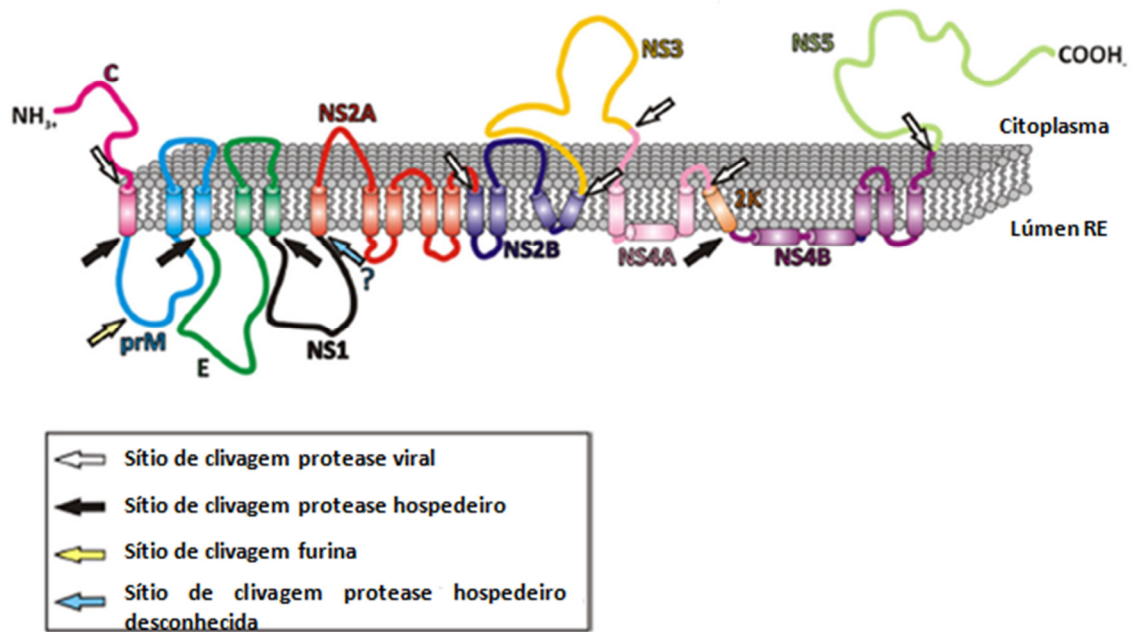


Figura 02- Organização esquemática da poliproteína do DENV. Poliproteína prevista a partir de análises bioquímicas e celulares, que é posteriormente processada por proteases celulares e virais indicadas por setas. FONTE: Modificada de Asseberg et al., 2009.

Uma característica conservada do DENV e de outros flavivírus é a presença de sequências complementares invertidas nas extremidades do RNA. Pelo menos dois pares das regiões complementares e os nucleotídeos adjacentes são necessários para ciclização do genoma do DENV: as regiões 5'-3'CS e 5'-3'UAR, de 11 e 16 nucleotídeos respectivamente (GEBHARD et al., 2011).

1.4 Proteínas do DENV

As três proteínas estruturais (C, prM e E) são codificadas no primeiro terço do genoma enquanto as sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) são codificadas nos dois terços seguintes (CHAMBERS et al., 1990a). Durante a tradução do material genético no retículo endoplasmático (RE) algumas proteínas virais são translocadas para o lúmen do RE, através de várias sequências-sinais, e ancoradas através de seus domínios de ancoragem à membrana. A proteína C contém uma sequência sinal hidrofóbica

em sua porção C-terminal, que transloca a proteína prM para o lúmen do RE. A prM, por sua vez, contém dois domínios transmembrana, um com sinal de retenção e outro com uma sequência sinal, resultando na translocação da proteína E ao lúmen do RE. E ainda, uma sequência sinal na porção carboxila da proteína E é responsável pela translocação da proteína NS1 ao RE (FALGOUT et al., 1989). Já as proteínas C, NS3 e NS5 são citoplasmáticas e a NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são proteínas transmembranas largamente hidrofóbicas com pequenos segmentos hidrofílicos (LINDENBACH et al., 2007; MURRAY et al., 2008).

As clivagens das junções das proteínas C/prM, prM/E, E/NS1, e próxima da região carboxi-terminal da NS4a, no lúmen do RE, são realizadas por uma peptidase sinal derivada do hospedeiro (CHAMBERS et al., 1990a; STADLER et al., 1997). Já as clivagens entre as junções das proteínas NS2a/NS2b, NS2b/NS3, NS3/NS4a, NS4a/NS4b e NS4b/NS5, no citoplasma, são realizadas por uma serina protease codificada pelo vírus; a enzima responsável pela clivagem da NS1/NS2a ainda é desconhecida (Figura 02) (LINDENBACH e RICE, 2003).

1.4.1 Proteínas Estruturais

A proteína do capsídeo (C), com aproximadamente 11 KDa, é altamente básica. Os resíduos básicos estão concentrados nas extremidades N e C-terminal e, provavelmente, atuam de forma cooperativa na ligação específica ao RNA. Estes resíduos básicos estão separados por uma região hidrofóbica interna associada à membrana celular e que também pode ter participação na montagem do *virion*. A proteína C se dobra em um dímero, no qual cada monômero contém quatro alfa-hélices. Ainda não está claro como os dímeros da proteína C são organizados, mas a dimerização é induzida pela interação com o RNA para montagem do nucleocapsídeo (LINDENBACH et al., 2007).

A proteína precursora de membrana (prM), de aproximadamente 26 kDa, atua como uma chaperona para proteína E, garantindo seu dobramento correto (LOREZ et al., 2002) além de proteger o domínio de fusão da proteína de envelope (E) durante o trânsito pelos compartimentos ácidos do retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi, evitando assim fusão da mesma antes da liberação da partícula viral madura (PERERA; KUHN, 2008). Durante a conversão de partículas imaturas para *virions* pela via secretora, a proteína prM é clivada pela enzima furina, encontrada no trans-Golgi, formando a proteína de membrana (M), de aproximadamente 8 KDa, e o segmento N-terminal pr é secretado no meio extracelular (LINDENBACH et al., 2007). Assim, esta clivagem que precede a liberação do vírus da célula e parece ser um evento terminal na morfogênese do vírion, resulta na reorganização da estrutura superficial do vírus para exposição do domínio de ligação do receptor E, aumentando a infectividade viral (YU et al., 2008).

O bloqueio da prM por tratamento de cloreto de amônia ou por mutação no local de clivagem da furina leva a liberação de vírions não infecciosos, imaturos (GUIRAKHOO et al., 1992; ELSHUBER et al., 2003). Outros estudos revelam que anticorpos contra a proteína prM são capazes de proteger camundongos contra infecção pelo vírus dengue (KAUFMAN et al., 1989), assim como peptídeos sintéticos de domínios das proteínas prM e M são capazes de induzir anticorpos neutralizantes e proteger camundongos (VÁZQUEZ et al., 2002).

A superfície do vírus consiste em um arranjo compacto de 180 cópias da glicoproteína de envelope (E) (Figura 04) no envelope lipídico viral (MURPHY e WHITEHEAD, 2011). A glicoproteína E, com aproximadamente 55kDa, é a maior proteína de superfície exposta do vírion sendo responsável por mediar o início da infecção através da ligação com receptores da célula hospedeira e fusão com a membrana celular para entrada do vírus (LAI et al., 2008; LOK et al., 2008; HUANG et al., 2010). A glicoproteína E desempenha um papel central na geração de anticorpos neutralizantes. Além disso, possui determinantes antigênicos para

hemaglutinação e neutralização (HENCHAL et al., 1985). A glicoproteína E também possui domínios transmembrana, adjacentes à extremidade C-terminal, os quais servem para ancorar esta proteína na membrana e atuam como sequências de sinal para a translocação de NS1 (LINDENBACH et al., 2007).

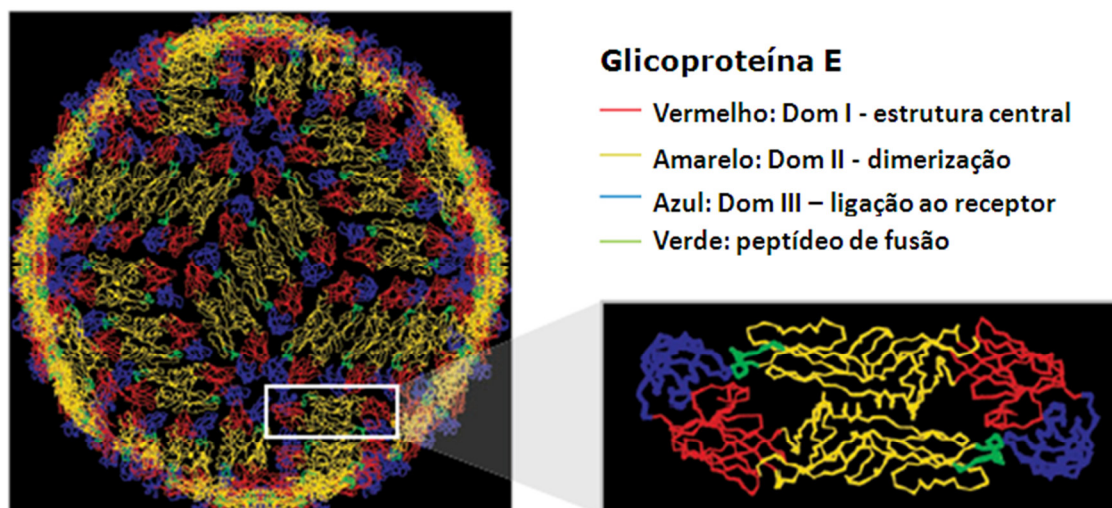


Figura 03- Representação esquemática do homodímero da Glicoproteína E do DENV. A partícula do vírus maduro consiste em uma matriz plana de homodímeros da Glicoproteína E. Os domínios estruturais/funcionais da Glicoproteína E estão identificado por esquema de coloração. FONTE: Modificada de Murphy e Whitehead, 2011.

A conformação molecular da proteína E é altamente dependente do pH do ambiente: em pH relativamente básico as moléculas da proteína E são arranjadas em uma conformação dimérica e estabelece planos ao longo da superfície do vírus em um padrão de espinha de peixe, dando ao vírus sua característica aparentemente lisa, já em pH relativamente ácido do compartimento endossomal, as moléculas de proteína E mudam para uma conformação trimérica, com a exposição do peptídeo de fusão no topo do trímero, e se projetam da superfície do vírus durante o processo viral de fusão da membrana endossomal, facilitando a liberação do genoma viral no citoplasma da célula (MUKHOPADHYAY et al., 2005; MURPHY e WHITEHEAD, 2011).

Usando cristalografia de raios X, os três domínios da proteína E foram caracterizados em DENV-2 e DENV-3. O domínio I está localizado no centro e é formado por oito folhas-beta que formam um motivo tipo β -barril; o domínio II possui um *loop* de fusão interna que está envolvido na fusão do vírus com a membrana endossomal e dimerização da proteína E; o domínio III é um domínio com estrutura de reconhecimento por imunoglobulinas e está envolvido na ligação com receptores da célula hospedeira (ALLISON et al., 2001; LAI et al., 2008; LOK et al., 2008).

A sequência de aminoácidos de E determina um dos quatro sorotipos do DENV. Os resíduos de aminoácidos são altamente conservados com no mínimo de 90-96% de similaridade (CHU et al., 1989; LANCIOTTI et al., 1997), no entanto, a similaridade da sequência de aminoácidos está na faixa de 60-70% (WESTAWAY e BLOK, 1997).

Os resíduos de aminoácidos que diferem os sorotipos tendem a ficar expostos na superfície externa do vírion e são distribuídos entre os três domínios (MODIS et al., 2005). A localização destes aminoácidos que diferem entre os sorotipos, sugere que o DENV evoluiu em parte para escapar da neutralização de anticorpos amplamente distribuídos na superfície do DI-III. Estudos sobre as respostas específicas de anticorpos em infecções humanas primárias do DENV sugerem que a resposta de anticorpos neutralizantes é ampla sendo que tanto o DIII e DI/DII neutralizam anticorpos (WAHALA et al., 2009).

1.4.2 Proteínas Não Estruturais

As proteínas Não Estruturais (NS) estão envolvidas no processamento da poliproteína, na replicação do RNA viral, montagem do vírus, e modulação das respostas das células hospedeiras (LINDENBACH et al., 2007; MURRAY et al., 2008). A proteína NS1 é uma glicoproteína de peso molecular aproximadamente de 46 KDa, com 12 resíduos de cisteína

extremamente conservados, sítios de glicosilação invariáveis, além de regiões de alta homologia entre os flavivirus (CHAMBERS et al., 1990a). Essa proteína parece desempenhar papel importante na replicação (MUYLAERT et al., 1997; LINDENBACH et al., 2007; SUZUKI et al., 2007).

A proteína NS1 é encontrada na superfície do vírus, ligada à membrana da célula infectada, sendo também secretada no meio extracelular (KURANE e ENNIS, 1992), explicando a produção de anticorpos detectada em soro de pacientes antes mesmo do RNA viral ser detectado por RT-PCR (ALCON et al., 2002). Essa proteína é em grande parte hidrofílica em teor de aminoácidos e como não tem domínios de transmembrana, a natureza da associação com a membrana ainda é desconhecida (LINDENBACH et al., 2007).

A imunização com NS1 é capaz de proteger camundongos da encefalite, após serem inoculados com vírus dengue (FEIGHNY et al., 1992) e protege camundongos frente à infecções com flavivirus homólogos (SCHLESINGER et al., 1987; MACKENZIE et al., 1996). No entanto, o mecanismo de proteção conferido pelas NS1 não é neutralizante das partículas virais, relaciona-se à destruição das células infectadas, via fixação do complemento, antes da liberação da progênie viral (KURANE e ENNIS, 1992). Desta forma, a NS1 é um importante alvo para o diagnóstico de infecção por dengue, uma vez que esta proteína circula em níveis elevados no sangue durante a fase aguda da doença. Além disso, foi demonstrado que os níveis de NS1 secretada no plasma têm correlação com os níveis de viremia e, portanto, também pode ser utilizada para diagnosticar pacientes em risco para o desenvolvimento de dengue hemorrágico (DAS et al., 2009).

A proteína NS2A com aproximadamente 22 KDa é a primeira das quatro pequenas proteínas hidrofóbicas (NS2A, NS2B, NS4A e NS4B) e sabe-se que constitui um importante componente do complexo de replicação (WESTAWAY et al., 2003) e que está envolvida na geração da membrana durante a montagem (LEUNG et al., 2008) além de existirem

evidências de que desempenha papel importante na incorporação do RNA às novas partículas virais (KÜMMERER e RICE, 2002). Além dessas funções, foi demonstrado em estudos com o DENV-2 que a NS2A pode agir como um antagonista do interferon (IFN) por inibição da sinalização de IFN (MUÑOZ-JORDÁN et al., 2003).

A NS2B de 14 KDa é uma proteína de membrana que possui um domínio hidrofílico conservado de 40 resíduos de aminoácidos que forma um complexo estável com a NS3, e assim, atuando como cofator da atividade serina protease da NS3 (NS3_{pro}) (CHAMBERS et al., 1990b, FALGOUT et al., 1991; LEUNG et al., 2001). Esse domínio é flanqueado por resíduos hidrofóbicos que promovem a associação entre o complexo da protease e a membrana das células infectadas (LEUNG et al., 2001).

A proteína NS3 é uma proteína citoplasmática multifuncional de 70 KDa que se associa à membrana do RE por interação com a NS2B ou é secretada. Possui capacidade imunogênica e é altamente conservada entre os Flavivirus (FALGOUT et al., 1991; LINDENBACH et al., 2007). A NS3 é composta por um domínio de protease (NS3_{pro}) e um domínio de helicase de RNA (NS3_{hel}) (ROSALES-LEON et al., 2007). Os primeiros 180 aminoácidos da região N-terminal, cerca de um terço dessa proteína, possui atividade de serina protease na clivagem pós-traducional da proteína viral, sendo que esta atividade requer uma porção da NS2B como citado anteriormente. A porção C-terminal dos outros dois terços dessa proteína possui atividades trifosfatases (*Nucleotide Triphosphatase* - NTPase e *RNA Triphosphatase* - RTPase) e helicase viral (NS3_{hel}) (WARRENER et al., 1993; LINDENBACH e RICE 2003; NALL et al., 2004).

A atividade RTPase da NS3 está envolvida na formação do *cap* na extremidade 5' do genoma (FALGOUT et al., 1991; LINDENBACH e RICE, 2003) e a atividade do NS3_{hel} parece ser de separar a fita do novo RNA da fita molde e auxiliar no desdobramento da estrutura secundária do RNA na região 3' não transcrita (CHAMBERS et al., 1990a;

LINDENBACH et al., 2007). Sendo a atividade helicase da NS3 essencial para a replicação viral, a NS3 é um importante alvo no desenvolvimento de drogas para terapia anti-viral (MATUSAN et al., 2001; LESCAR et al., 2008).

A presença de NS3 estimula a destruição de células infectadas através dos linfócitos T (LT) citotóxicos. As células LT helper e citotóxicos de pacientes com dengue apresentam capacidade de reconhecer epítomos de E, NS1 e NS3 (KURANE e ENNIS, 1992).

A proteína NS4 é clivada, gerando as proteínas NS4A e NS4B, com 16 KDa e 27 KDa respectivamente, são proteínas hidrofóbicas associadas à membrana. A NS4A parece induzir rearranjos nas membranas da célula hospedeira (MILLER et al., 2007) e isto inclui a formação de vesículas pela invaginação da membrana do RE para formar o local de replicação viral (WELSCH et al., 2009). A NS4B também está envolvida na inibição da síntese de interferon (MUÑOZ-JORDÁN et al., 2003) e pode modular a replicação viral via sua interação com NS3 (MUÑOZ-JORDÁN et al., 2005).

A proteína NS5, de aproximadamente 103 KDa, é a maior e mais conservada proteína viral, com mais de 75% de homologia entre os quatro sorotipos de DENV. Possui duas atividades enzimáticas: de RNA polimerase RNA dependente na sua extremidade C-terminal e S-adenosil metiltransferase na extremidade N-terminal, responsável juntamente com a RTPase da NS3, pela síntese do *cap* viral (EGLOFF et al., 2002). Além disso, a NS5 pode induzir a transcrição e tradução de interleucina 8 (IL-8) (LINDENBACH e RICE, 2003) que está relacionada com a trombocitopenia e ao aumento dos níveis séricos de alanina transaminase, um indicador de lesão hepática, e é responsável por mediar a permeabilidade vascular durante a infecção pelo DENV (ESPADA-MURAO e MORITA, 2011).

1.5 Ciclo do DENV

As células alvo do vírus DENV são principalmente células dendríticas, monócitos e macrófagos (ACOSTA et al., 2008; KRISHNAN et al., 2007), no entanto, vários estudos demonstram que os DENV tem capacidade de infectar outras células humanas como linfócitos B, linfócitos T, células endoteliais, hepatócitos e células neurais (ANDERSON, 2003).

O DENV entra na célula alvo por endocitose mediada por receptores que se ligam com a proteína E do vírus, porém ainda não se sabe exatamente quais proteínas de superfície celular estão envolvidas na ligação do vírus com a célula hospedeira. Diferentes receptores já foram propostos, como: heparan sulfato (CHEN et al., 1997; HILGARD e STOCKERT, 2000; LIN et al., 2002), “*heat shock protein*” 70- HSP70 e “*heat shock protein*” 90-HSP90 (VALLE et al., 2005), GRP78-BiP (JINDADAMRONGWECH et al., 2004), CD14 (CHEN et al., 1999), receptor de 37/67-kDa de alta afinidade pela laminina (THEPPARIT e SMIT, 2004) e “*dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin*”-DC-SIGN (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003; LOZACH et al., 2005).

O pH ácido do endossoma proporciona uma mudança conformacional na proteína E do vírus, promovendo a fusão do envelope viral com a membrana endossomal e então liberando o capsídeo no citoplasma. Após o desencapsulamento, o genoma viral é liberado no citoplasma e serve como RNA mensageiro para a tradução das proteínas estruturais e não estruturais (poliproteína) que é dirigida ao RE (Figura 04). O processamento desta poliproteína, realizado por proteases hospedeiras que residem no lúmen do RE e pela proteína NS3 com seu co-fator NS2B no citoplasma, deve ocorrer fundamentalmente antes da replicação do RNA viral (CHAMBERS et al., 1990a; FALGOUT e MARKOFF, 1995). A replicação do RNA viral ocorre em duas etapas, primeiro o RNA de polaridade positiva serve de molde para a síntese de RNA de polaridade negativa que servirá de molde para a síntese de

múltiplas fitas de RNA positivas. Essas, por sua vez, serão utilizadas na síntese de novas fitas de polaridade negativa e na tradução de proteínas virais, além de serem utilizadas na montagem dos virions imaturos (CLEAVES et al., 1981; WESTAWAY et al., 1999).

Os nucleocapsídeos são montados no citoplasma e seguem para a membrana do RE onde ocorre o brotamento interno (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). A montagem das partículas virais ocorre em associação com o RE, onde são encapsuladas pela proteína C e adquirem uma bicamada lipídica com proteínas prM e E, resultando em vírus imaturos, que são transportados pela via secretora. Nas redes de Golgi ocorre a glicosilação de prM, E e NS1 e em um estágio tardio da morfogênese viral a furina cliva a prM em M para gerar os vírus maduros que são liberados por exocitose (STADLER et al., 1997; MACKENZIE e WESTAWAY et al., 2001; YU et al., 2008).

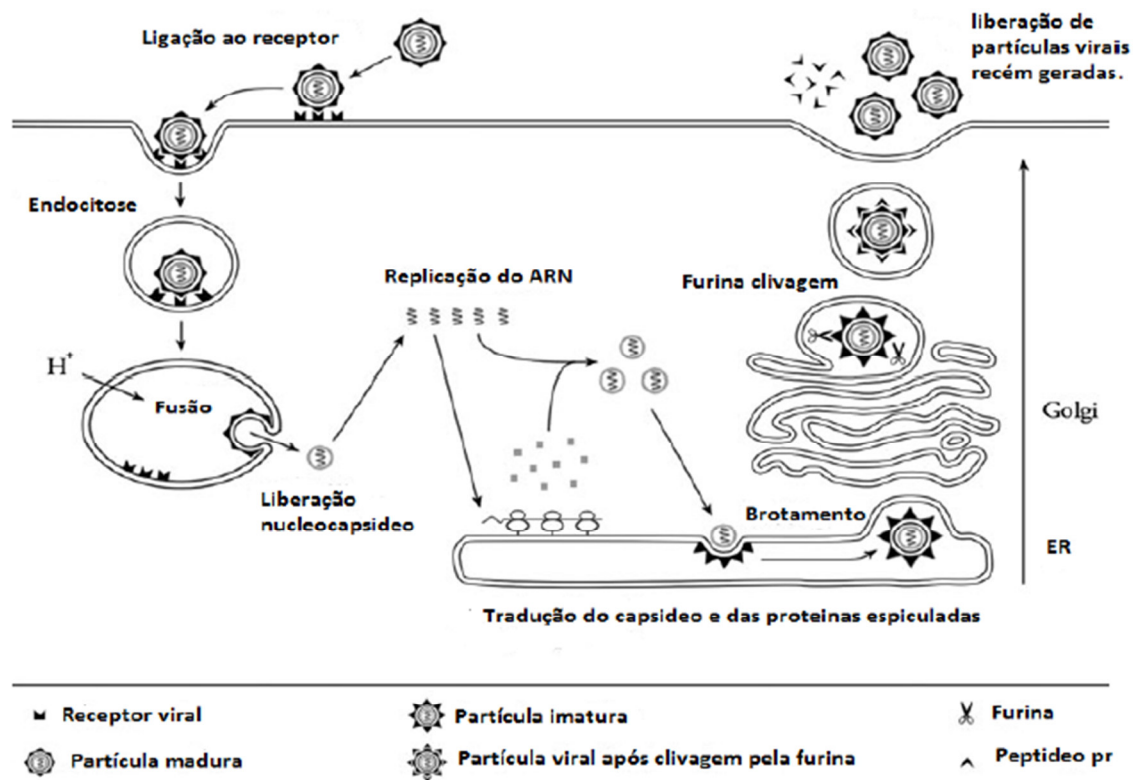


Figura 04- Ciclo do DENV. O DENV entra na célula por endocitose, mediado por receptores que se ligam à proteína E do vírus. O pH ácido do endossoma promove a fusão do envelope viral com a membrana endossomal e consequente desencapsulamento. Após a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma, ocorre a tradução da poliproteína viral que é dirigida ao RE, onde é processada. A montagem dos nucleocapsídeos ocorrem no citoplasma e em seguida seguem para o RE, onde ocorre o brotamento interno. As partículas imaturas seguem para o complexo de Golgi, sofrem mudanças conformacionais e em um estágio tardio a furina cliva prM em pr e M para gerar os vírus maduros que são liberados por exocitose.

FONTE: Modificada de RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010.

1.6 Diagnósticos Laboratoriais da Dengue

O diagnóstico preciso e eficiente da dengue é importante para diferenciar a dengue de outras doenças, orientar a conduta clínica, confirmação de casos de FHD/SCD, vigilância epidemiológica, estudos da patogenia e pesquisas de vacinas. Os diagnósticos laboratoriais da dengue podem ser realizados por isolamento viral, sorologia, detecção do genoma viral ou antígeno viral (GUZMÁN e KOURÍ, 1996; OLIVEIRA et al., 2011).

Nos últimos anos grandes progressos foram feitos no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas para dengue, o que resultou na disponibilidade de testes adequados para cada estágio da doença. A viremia da dengue é curta, observada geralmente de dois a três dias antes do aparecimento da febre até quatro a cinco dias depois. A detecção viral, no entanto, pode ser realizada a partir de amostras recolhidas nos primeiros cinco dias de sintomas da doença (GUZMÁN e KOURÍ, 2004).

A resposta humoral à infecção apresenta-se com dois padrões distintos que dependem da condição imunológica do paciente infectado. Quando a infecção por dengue ocorre em pessoas que não tenham sido previamente infectadas com um flavivírus ou imunizadas com vacina de flavivírus, ocorre o desenvolvimento de infecção primária pelo DENV. Em pacientes com infecção primária pelo DENV o anticorpo IgM anti-dengue desenvolve-se rapidamente e é detectável geralmente de 3 a 5 dias após o início dos sintomas, com pico após duas semanas e decai até níveis indetectáveis após dois meses. Os níveis de anticorpo IgG anti-dengue se elevam depois de 9 a 10 dias e permanecem detectáveis pela vida toda do indivíduo (Figura 05). Em pacientes com infecção secundária a cinética de produção do anticorpo IgM anti-dengue é semelhante ao observado em pacientes com infecção primária, no entanto, os níveis são significativamente menores. Em contrapartida, durante a infecção

secundária o IgG é dominante, detectado em altos níveis, mesmo na fase aguda, e persiste até 10 meses depois (GUBLER, 1996; SHU e HUAHG, 2004).

Vários métodos de diagnósticos laboratoriais, sorológicos e moleculares, foram desenvolvidos, porém sua escolha depende da finalidade do teste (diagnóstico clínico, levantamento epidemiológico, desenvolvimento de vacinas ou pesquisas em virologia básica, epidemiologia e patogênese do vírus da dengue), de instalações laboratoriais adequadas, conhecimentos técnicos adequados, custos do teste e tempo de coleta das amostras (SHU et al., 2004; WHO, 2009).

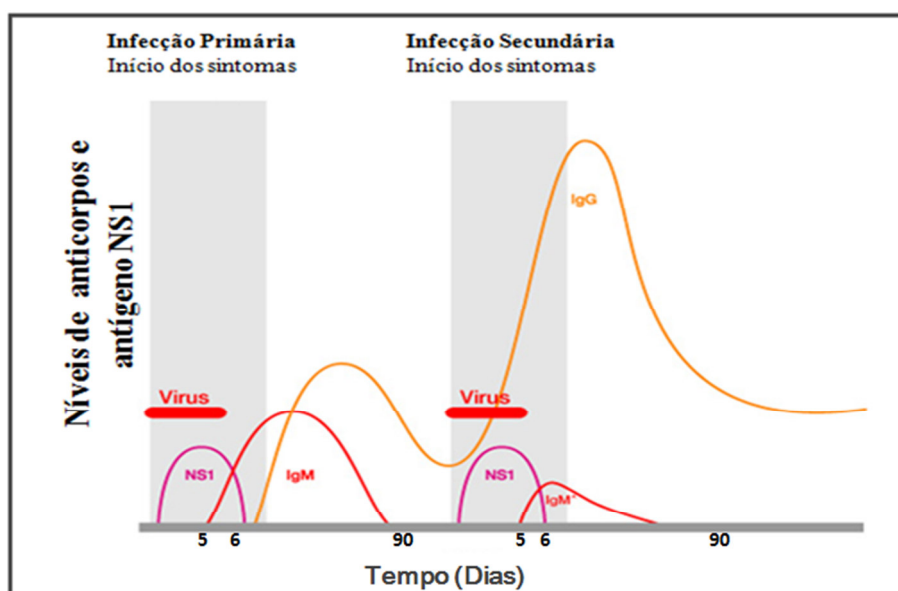


Figura 05- Representação esquemática dos níveis de anticorpos específicos anti-dengue IgM (vermelho) e IgG (laranja), níveis do antígeno NS1 (roxo) e viremia durante infecção primária e secundária
 FONTE: Modificada de <http://www.retroscope.eu/wordpress/dengue-virus/>.

1.6.1 Isolamento Viral

O período de viremia do DENV é curto, por isso as amostras para isolamento viral devem ser colhidas até 4 a 5 dias do início do período febril. O vírus pode ser recuperado a partir do soro, plasma e até mesmo de tecidos obtidos em autópsia como tecidos de fígado,

baço, linfonodos, pulmão e timo (SCOTT et al, 1980; VORDNAM e KUNO, 1997). O isolamento viral, que permite a direta evidência da presença do vírus ou do RNA viral, atualmente pode ser realizado por inoculação intra-cerebral em camundongos neonatos, infecção de linhagens de células de mosquito, inoculação intratorácica em mosquitos adultos e inoculação em culturas de células de mamíferos (DE PAULA e FONSECA, 2004; GUZMAN e KOURI, 1996; WHO, 2009).

O isolamento do vírus por inoculação em células de Mosquito é a metodologia mais utilizada para isolamento do DENV, embora culturas de células de mamíferos também sejam utilizadas, como células VERO, células LLC-MK2 e BHK21 (GUZMÁN e KOURÍ, 1996). A inoculação em células C6/36 de *Aedes albopictus* é o método mais comum (IGARASHI, 1978; GUBLER et al, 1984), no entanto outras células como AP61 e AP64 de *Aedes pseudoscutellaris*, Tra-284 de *Toxorhynchites amboinensis*, CLA-1 obtidas de clones de AP61, são utilizadas com eficiência para isolamento do vírus (SINGH e PAUL, 1968; RACE et al., 1979; GUZMÁN e KOURÍ 1996; MORIER et al., 1991). Após um período que permita a replicação do vírus, a identificação é realizada por imunofluorescência indireta (IFI) utilizando anticorpos monoclonais ou por PCR (HENCHAL et al., 1983; GUZMÁN e KOURÍ, 2004; GUZMÁN et al., 2010).

1.6.2 Detecção do Genoma Viral

Muitos ensaios para detecção do genoma viral da dengue foram desenvolvidos para o diagnóstico da infecção. A técnica de reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa (RT-PCR) é considerada simples, rápida e sensível e possibilita a detecção do genoma e tipagem dos vírus, simultaneamente, em amostras clínicas humanas, biópsias ou tecidos de autópsia que podem estar armazenadas por longos períodos (DEUBEL et al., 1990;

ALVAREZ et al., 1996). Vários protocolos de RT-PCR foram descritos nas ultimas duas décadas e o originalmente descrito por Lanciotti et al (1992) e mais tarde modificado para multiplex RT-PCR por Harris et al (1998), tornando-se bem conhecido e muito utilizado nas Américas. Estes ensaios utilizam genes conservados, como o C/prM, como alvo para detecção do vírus DENV e podem determinar o sorotipo infectante pela análise dos tamanhos dos produtos amplificados.

O PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) tem várias vantagens em relação aos métodos convencionais de PCR ou RT-PCR, pois além de detectar é capaz de quantificar o RNA viral no soro de pacientes infectados, além de ser rápido, possuir menor taxa de contaminação, sensibilidade mais elevada, maior especificidade e fácil padronização (SHU et al., 2003; SHU e HUANG, 2004). O PCR em tempo real é um ensaio com um só passo, no qual a detecção do alvo amplificado ocorre por sondas fluorescentes, substituindo a necessidade de posterior eletroforese, e ainda, podem detectar um único sorotipo por reação (“singleplex”) ou identificar os quatro sorotipos em uma única amostra (“multiplex”) (POERSCH et al., 2005; GUSMÁN et al., 2010).

1.6.3 Diagnóstico Sorológico

Os testes sorológicos são os mais utilizados para o diagnóstico de infecção por DENV por serem mais baratos, no entanto os anticorpos só podem ser detectados cinco dias após o desenvolvimento da doença sendo inviável para diagnóstico rápido, além das possíveis reações cruzadas entre os diferentes sorotipos do DENV e outros flavivírus (DE PAULA e FONSECA, 2004).

1.6.3.1 Inibição de Hemaglutinação (IH)

A IH é pouco utilizada atualmente, mas é tradicionalmente realizada para diferenciar uma infecção por DENV primária ou secundária por sua sensibilidade, simplicidade e reprodutibilidade (WHO, 1997). Esta técnica tem como princípio a capacidade dos anticorpos de inibir a hemaglutinação de hemácias mediada pelas glicoproteínas virais e, desde o seu desenvolvimento em 1958, permaneceu praticamente inalterado (VORNDAM e KUNO, 1997). As amostras devem ser pareadas com intervalos de mais de sete dias e a técnica não diferencia o tipo de flavivírus, assim como o sorotipo do DENV, sendo fatores limitantes da técnica (INNIS et al., 1989).

1.6.3.2 Reação de Fixação do Complemento

O teste de reação de fixação do complemento (RFC) não é muito utilizado para diagnóstico de rotina da dengue devido a dificuldades técnicas. O teste é baseado na ativação do sistema complemento induzido pelo complexo antígeno-anticorpo. Os anticorpos detectáveis pela RFC aparecem depois dos anticorpos inibidores da hemaglutinação e persistem por pequeno período, limitando os estudos soro epidemiológicos. O teste de FC é muito específico para infecções primárias, contribuindo para determinação do sorotipo da dengue (VORNDAM e KUNO, 1997).

1.6.3.3 Teste de Neutralização por Redução de Placa

O teste de neutralização por redução de placa (TNRP) é o teste mais sensível e específico para o diagnóstico do vírus DENV, no entanto é trabalhoso, demorado e

tecnicamente difícil (GUBLER, 1998). No TNRP as diluições da amostra de soro do paciente são incubadas com quantidades definidas do vírus. O resultado é dado com referência ao título na mais alta diluição do soro que reduz o número de placas de 50 a 80% (VORNDAM e KUNO, 1997). Por sua elevada especificidade, pode ser empregado para identificar o sorotipo infectante em infecções primárias por dengue, na fase de convalescência, devido os anticorpos neutralizantes detectados serem relativamente monotípicos para o vírus infectante. Em infecções secundárias e terciárias a determinação do sorotipo infectante pelo teste de neutralização não é confiável (GUZMÁN e KOURÍ, 1996).

1.6.3.4 ELISA

O teste ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assays*) é o teste mais utilizado para o diagnóstico da dengue devido sua alta sensibilidade, fácil utilização e por ser relativamente barato. São usados para detectar anticorpos específicos anti-dengue durante a fase aguda da doença (IgM) e na fase de convalescença (IgG), além da detecção de antígenos (KUNO et al., 1991; DE PAULA e FONSECA, 2004; GUZMÁN et al., 2010). O ELISA também é utilizado para determinar infecção primária ou secundária, através da relação IgM/IgG, em que razões $\geq 1,2$ indicam infecção primária e valores $< 1,2$ servem de marcadores para infecção secundária (SHU et al., 2003; SHU e HUANG, 2004). Existem vários formatos de ELISA e os mais comuns são ELISA indireto e ELISA captura (Figura 06).

No ELISA de captura, conhecido também como MAC-ELISA (*IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*) ou GAC-ELISA (*IgG antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*), anticorpos anti-humanos IgM (anti-cadeia μ da imunoglobulina M) ou IgG são fixados na placa e, após o bloqueio (leite desnatado a 2% diluído em PBS tween 0,05%), reagem com antígenos da amostra. Após a adição de um anticorpo conjugado à uma

enzima, e o cromógeno, a intensidade da cor também é medida em espectrofotômetro, que neste caso é proporcional à concentração de antígenos. O MAC-ELISA possui 90% de sensibilidade e 98% de especificidade em amostras de soro de até 5 dias após início da febre, e ainda, outros tipos de amostras como urina e saliva já foram utilizadas na detecção de IgM anti-dengue (GUZMÁN e KURÍ, 2004; GUZMÁN et al., 2010). A detecção do anticorpo IgM requer tempo de coleta apropriado e seus resultados podem ser confundidos por reações falso-positivas, devido o IgM anti-DENV apresentar extensa reação cruzada, e por uma presença prolongada desses anticorpos em alguns indivíduos (OLIVEIRA et al., 20011). Pode ocorrer, ainda, um diagnóstico falso negativo, no qual a infecção não é detectada, porque em caso de uma segunda infecção, há uma maior produção dos anticorpos IgG, que podem mascarar o resultado, pois aqueles efetivamente identificados pelo teste MAC-ELISA, os IgM, são produzidos em quantidade muito baixa.

O ELISA indireto é amplamente utilizado para pesquisas de anticorpos e apresenta como vantagens a possibilidade de utilizar um único conjugado em diferentes sistemas e conjugado classes específicos para determinação de anticorpos de diferentes classes. Neste ensaio, placas plásticas são sensibilizadas com antígeno, que após o bloqueio, reage com anticorpos na amostra. Para revelar a reação, a enzima peroxidase presente no IgG anti-mouse reduz o substrato, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ocasionando a oxidação do cromógeno solúvel, que passa de incolor para solução colorida, como nos cromógenos ortofenilenodiamina (OPD) e tetrametilbenzidina (TMB). A reação é interrompida, e a intensidade de cor é medida em espectrofotômetro. O grau de degradação do substrato, geralmente indicado pela intensidade de cor da solução, é proporcional a concentração de anticorpo.

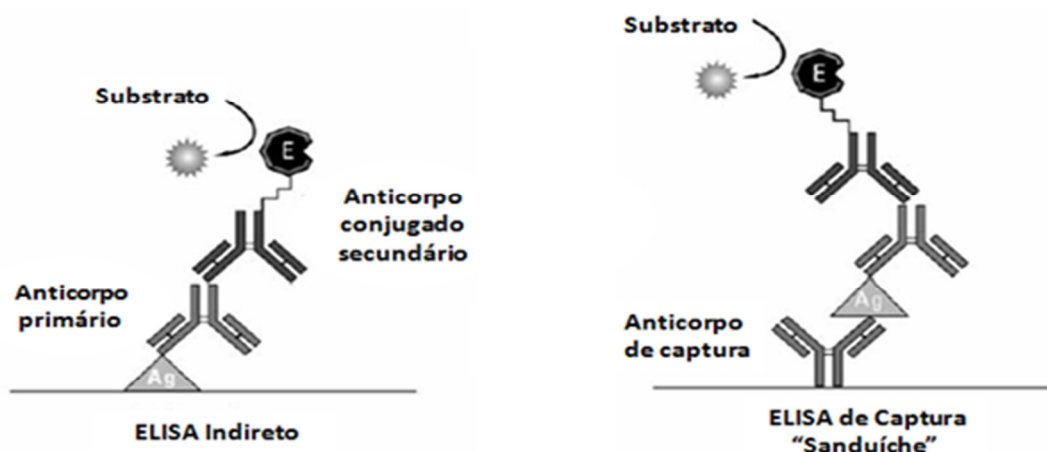


Figura 06- Esquema da técnica do ELISA Indireto e ELISA de Captura.

FONTE: Modificado de Thermo Scientific - ELISA Technical Guide and Protocols

Os antígenos para diagnósticos sorológicos necessitam ser confiáveis e proporcionar grande especificidade para uma gama de anticorpos a serem testados. Os antígenos utilizados nos testes, as partículas virais inativas de cultura de células (FIGUEIREDO et al., 1989) e de cérebro de camundongo infectados (INNIS et al., 1989), podem gerar reações cruzadas com outros sorotipos do DENV e com outros flavivírus. As proteínas recombinantes são alternativas à utilização de partículas virais completas como antígenos, sendo a proteína recombinante E a mais indicada por estar exposta na superfície viral e ser responsável pela interação com receptores celulares e ser o alvo principal dos anticorpos neutralizantes (JAISWAL et al., 2004).

1.6.4 Detecção de antígeno

O NS1 é uma glicoproteína, essencial para replicação viral, é produzida por todos os flavivírus. O antígeno NS1 é secretado na corrente sanguínea desde o primeiro dia da doença, permanecendo na forma solúvel até o quinto ou sexto dia, e por isso vem sendo utilizado como ferramenta de detecção precoce da dengue (SHU et al., 2009). Ensaio imunoenzimáticos e imunocromatográficos para detecção da proteína viral NS1 estão

disponíveis no mercado, embora eles não diferenciem entre os sorotipos do dengue, são bastante úteis em locais de pouca infraestrutura, por apresentarem resultados rápidos e confiáveis, podendo ser usados para diagnóstico, desde que as amostras sejam obtidas na fase inicial da infecção (DA SILVA et al., 2011). A presença de NS1 no soro de pacientes também é reflexo dos níveis de viremia no plasma, sendo os níveis do antígeno maiores em pacientes com FHD do que em DF (LIBRATY et al., 2002; HANG et al., 2009; HONDA et al., 2012).

1.7 Epidemiologia da Dengue

A distribuição global da dengue ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais da Ásia e Américas. A dengue é a doença viral transmitida por mosquito de mais rápida propagação, 50 milhões de infecções por dengue ocorrem por ano e cerca de 2,5 bilhões de pessoas em todo o mundo vivem, em áreas urbanas e rurais, onde a dengue é endêmica (WHO, 2009).

No Brasil a dengue é considerada uma doença reemergente, pois afetou o país em meados do século XIX e início do século XX e foi eliminada por um longo período de 1923 à 1981 (GUBLER, 1998; TAUILL, 2001). Em 1981/1982 foi registrada a primeira epidemia confirmada clínica e laboratorialmente no município de Boa Vista - RR em que foram identificados os sorotipos DENV-1 e DENV-4 que infectaram cerca de 11 mil pessoas (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1982; OSANAI et al., 1983).

O Brasil vem apresentando ciclos marcados pelo predomínio de um determinado sorotipo do vírus. Em 1986 houve a ocorrência do DENV-1 no Rio de Janeiro e estados do Nordeste e em 1990 ocorreu a introdução do DENV-2 no Rio de Janeiro, provocando uma epidemia que atingiu outros estados do Sudeste. Nos dois primeiros anos da década de 1990, a dengue praticamente esteve restrita a cidades do Rio de Janeiro, Ceará, Alagoas e

Pernambuco, e algumas poucas notificações no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (TEIXEIRA et al., 1999). Nos anos seguintes, a circulação viral do DENV-1 e DENV-2 se expandiu rapidamente pelo território brasileiro, acompanhando a expansão do *Aedes aegypti*. Ao final de 1998 esses vírus circulavam em 49% do país (TEIXEIRA et al., 2005).

O DENV-3 foi notificado e isolado pela primeira vez no Brasil no ano de 1998 no estado de São Paulo de um caso importado da Nicarágua (ROCCO et al., 2001). Em 2000 este mesmo sorotipo foi isolado no estado do Rio de Janeiro de um caso autóctone (NOGUEIRA et al., 2001) e nos anos seguintes, 2001-2002, ocorreu a maior e mais grave epidemia de dengue no Rio de Janeiro, com cerca de 800 mil casos, elevado número de casos de óbitos e dengue hemorrágica, possivelmente, justificados pelo predomínio de DENV-3, enquanto em epidemias anteriores predominaram o DENV-1 e DENV-2 (CASALI et al., 2004; BARRETO e TEIXEIRA, 2008).

O DENV 4 isolado durante um surto no estado de Roraima entre os anos de 1981 e 1982 (OSANAI et al., 1983), manteve-se indetectável até ser isolado na cidade de Manaus em 2008 (DE FIGUEIREDO et al., 2008) e, após três décadas, em Julho de 2010, o DENV-4 foi isolado novamente em Boa Vista, Roraima em 3 casos autóctones (TEMPORÃO et al., 2011). A re-invasão do DENV-4 em 2010, em Roraima, não foi seguida de epidemia, porém, os primeiros casos considerados resultado da propagação do DENV 4, a partir de Roraima, foram detectados em Janeiro de 2011, no Amazonas e Pará, seguidos de estados do Nordeste (Piauí, Pernambuco, Bahia e Ceará) até ser detectado pela primeira vez no Sudeste, nos estados do Rio de Janeiro (NOGUEIRA e EPPINGHAUS, 2011) e em São Paulo (ROCCO et al., 2012). Com essa propagação, o antigo temor da entrada desse sorotipo, no qual praticamente não havia imunidade em nosso país, se concretizou, representando importante risco para a ocorrência de novas epidemias e aumento de casos graves.

Segundo Ministério da Saúde, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública, em 2012 foram detectados a circulação no Brasil do DENV-1 (31,5%), DENV-2 (3,9%), DENV-3 (0,5%) e DENV-4 (64,1%) nos estados da Federação mais o Distrito Federal (Figura 07). O único estado em que não houve isolamento foi Santa Catarina por ter enviado apenas uma amostra em todo o ano, cujo resultado foi negativo para os sorotipos de dengue. A predominância de um diferente sorotipo do dengue cria a possibilidade de alterações no padrão de ocorrência da doença.

No estado de Rondônia, segundo Boletim Epidemiológico da Dengue – Semana de 01(30/12/2012) a 49(07/12/2013) da Agência Estadual de Vigilância em Saúde de Rondônia, dos sorotipos virais isolados, houve uma predominância do sorotipo 4 (67%), seguido pelo sorotipo 1(30%). Até a data citada, havia o registrado da circulação de três sorotipos virais no Estado: sorotipos 1, 2 e 4, não sendo ainda identificado o sorotipo 3 no ano de 2013.

Entre 2002 e 2012 foram registrados cerca de 5,3 milhões de casos de dengue no Brasil, com destaque para epidemias ocorridas em 2002, 2008 e 2010 em que se observou o predomínio do DENV 3, DENV 2 e DENV 1, respectivamente. Em 2010 foram mais de 1 milhão de casos de dengue registrados pelo Ministério da Saúde, e nos anos seguintes ainda continuaram acima de 500 mil casos (765.032 casos em 2011 e 591.384 casos em 2012). Em 2012, quanto ao números de casos por Unidades Federadas, os maiores índices ocorreram respectivamente no Rio de Janeiro (181.000), Ceará (55.333), Bahia (49.433), Mato Grosso (33.260) e Pernambuco (32.567).

Até 16 de fevereiro de 2013, segundo os dados do Ministério da Saúde, foram notificados 204.650 casos no país. Deste total, 324 foram notificados como casos graves e 33 óbitos. Comparando esses resultados com igual período de 2012, o que se nota é uma aumento de 190% nos casos notificados (70.489 casos em 2012), e uma importante redução de 44% nos casos graves (577 casos em 2012) e de 20% nos óbitos (OPAS, 2013).

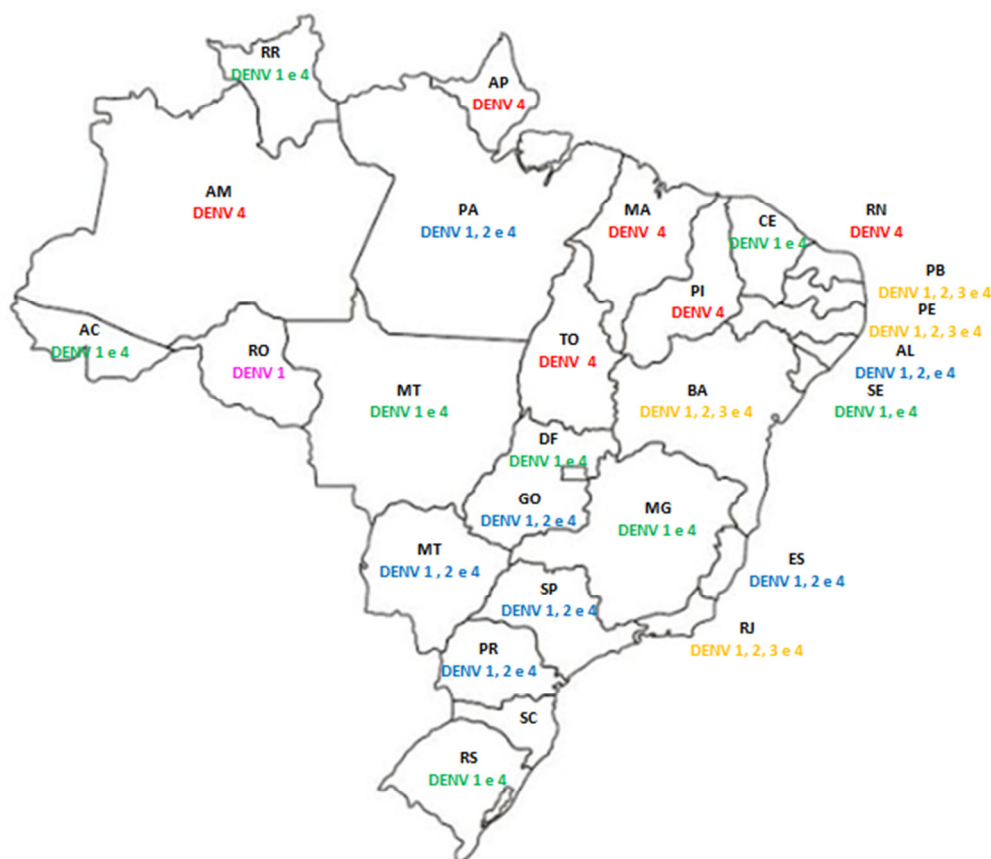


Figura 07- Sorotipos de dengue identificados por UF, Brasil, 2012

FONTE: CGLAB/DEVIT/SVS/MS.

Uma das principais mudanças na epidemiologia da dengue na última década é o aumento do número de óbitos também acompanhado pela tendência de aumento da FHD e DCC. Desde 2002, os óbitos por dengue no Brasil superam os óbitos por malária (BRASIL, 2011). Quanto aos óbitos nos últimos dois anos por casos graves da dengue no Brasil, que inclui os óbitos por FHD e DCC, foram confirmados 283 óbitos em 2012, contra 482 óbitos em 2011 e 656 óbitos em 2010, representando queda de 41% nos óbitos em relação a 2011 e 57% em relação a 2010 (Tabela 01) (BRASIL, 2013b).

Outra importante modificação na epidemiologia da dengue foi o aumento do percentual de casos em menores de 15 anos de idade no período de 2002 a 2010, sendo de 17% em 2002 e atingindo um pico 27,5% em 2008. A análise dos óbitos por dengue entre 2007 e 2009 evidenciou uma redução da mediana de idade para 30 anos, sendo 25% desses

óbitos em menores de 15 anos. Entretanto, em 2010 esse aumento foi observado em maiores de 60 anos de idade e a média da idade dos óbitos passou a ser de 42 anos (BRASIL, 2011).

No estado de Rondônia os casos de dengue aumentaram significadamente a partir de 1999, passando de 701 casos para 18.865 em 2010 e a taxa de incidência subiu de 7,63 para 365,9 por 100 mil habitantes. No caso de notificações de casos graves, ocorreu elevação no número de casos de todos os tipos de manifestações e ocorrência de óbitos (Tabela 02). A partir de 2004 o DENV-3 foi introduzido no estado de Rondônia, ocorrendo a cocirculação dos sorotipos 1 e 3. Em 2010 foi identificado novamente a circulação do sorotipo 1 e 2 no estado (LUCENA et al., 2011) e possivelmente o DENV-4 já foi introduzido em Rondônia, como em muitos outros estados da federação.

O monitoramento contínuo da epidemiologia da dengue, em especial a cada alteração do sorotipo predominante do vírus, é fundamental para o planejamento, organização e operacionalização dos serviços de saúde e assim preparação do Sistema Único de Saúde (SUS) para se reduzir os óbitos decorrentes da doença.

Tabela 01- Casos, Incidência, Casos Graves e óbitos por Casos Graves de Dengue no Brasil, de 2003 -2012
 FONTE: SINAM/SVS/MS

	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Casos de Dengue	696.472	274.975	70.174	147.039	258.680	496.923
Incidência de Dengue	399,7	158,9	40,5	81,9	138,9	251,0
Casos Graves	7.353	3.454	780	1.845	2.913	5.983
Óbitos por Casos Graves	150	88	18	69	142	290
	2008	2009	2010	2011	2012	
Casos de Dengue	632.680	406.269	1.011.548	764.032	591.384	
Incidência de Dengue	292,8	205,5	530,3	400,5	304,9	
Casos Graves	24.571	10.418	17.474	10.546	3.965	
Óbitos por Casos Graves	561	341	656	482	283	

Tabela 02- Casos, Incidência, Casos Graves e óbitos por Casos Graves de Dengue em Rondônia, de 2003 -2012
 FONTE: SINAM/SVS/MS

	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Casos de Dengue	1.472	2.971	3.048	5.672	4.123	3.118
Incidência de Dengue	109,4	206,7	228,9	388,1	272,7	287,7
Casos Graves	15	30	19	56	47	15
Óbitos por casos graves	0	1	0	2	1	0
	2008	2009	2010	2011	2012	
Casos de Dengue	5.765	18.767	20.294	3.219	2.926	
Incidência de Dengue	373,4	1.345,8	1.298,9	206,0	184,0	
Casos Graves	51	312	367	32	14	
Óbitos por casos graves	4	17	18	3	1	

II- OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método diagnóstico da dengue utilizando como insumos peptídeos das proteínas Estrutural de Envelope (E), Não Estrutural 1 (NS1) e Não Estrutural 3 (NS3) do DENV, mapeados por ferramentas de bioinformática e expressos em sistema procariótico.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Buscar sequências dos genes da proteína de Envelope (E), Não Estrutural 1 (NS1) e Não Estrutural 3 (NS3) dos quatro sorotipos do vírus dengue no GenBank;
- 2- Mapear sequências de aminoácidos (aa) similares das três proteínas entre os quatro sorotipos do vírus dengue;
- 3- Definir peptídeos das três proteínas citadas acima, baseadas em características físico-químicas definidas por bioinformática;
- 4- Sintetizar quimicamente genes para expressão em sistema procarioto de peptídeos quiméricos com sequências de aa das três proteínas citadas, ligadas por trincas de glicina;
- 5- Expressar e purificar os peptídeos definidos para utilização como antígenos em ensaios do tipo ELISA indireto;
- 6- Testar os peptídeos selecionados e expressos para detecção de anticorpos em soros de pacientes já testados por metodologias de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*).

III- MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras Biológicas

As amostras biológicas utilizadas foram soros pertencentes à soroteca da Plataforma Técnica do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical – CEPEM de Rondônia, cedidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN/RO.

Foram utilizadas 722 amostras já caracterizadas, sendo 357 amostras para IgM (235 positivas e 122 negativas) e as outras 365 amostras para IgG (235 positivas e 130 negativas). As amostras foram coletadas entre janeiro de 2008 à julho de 2011 nas unidades básicas de saúde de Porto Velho e demais municípios do interior do Estado, sendo enviadas para confirmação laboratorial de dengue no LACEN/RO. Foram utilizados testes para pesquisa de anticorpos anti dengue (IgG e/ou IgM), *kits* de ELISA (PanBio Dengue Duo IgM Captura IgG) e ELISA de captura (PanBioPtyLtd, Brisbane, Austrália). Estes soros foram utilizados como controles positivos e negativos para testar a sensibilidade antigênica e especificidade dos peptídeos expressos.

3.2 Sequências Genômicas dos Vírus Dengue Utilizadas nos Alinhamentos e Definição das Sequências dos Peptídeos

Para cada sorotipo viral foram utilizados cepas de referência depositadas no *GenBank* (DENV1 Genbank accession nº AF180817_1; DENV2-New Guinea/Genbank accession nº M29095; DENV3- H87/ GenBank accession nº M93130 e DENV4- H241/ Genbank accession nº AY947539). As sequências nucleotídicas para cada sorotipo foram alinhadas utilizando o programa *Clustal W* (EBI-Europen Bioinformatics Institute) com cepas do mesmo sorotipo

para definição de sequências consensus de cada sorotipo, que foram traduzidas utilizando EditSeq (*DNAstar - Lasergene, USA*).

3.3 Mapeamento dos Peptídeos da Proteína de Envelope (E), Não Estrutural 1 (NS1) e Não Estrutural 3 (NS3)

Após definição de uma sequência consensus para cada um dos quatro sorotipos do DENV, foram selecionadas regiões com características desejáveis, tais como: antigenicidade, probabilidade de se apresentar na superfície e hidrofiliicidade. A seleção dos fragmentos foi realizada através da combinação de quatro métodos de análises: *Surface Accessibility Prediction* (Emini et al, 1985); *Flexibility Prediction* (Karplus e Schulz, 1985); *Hydrophilicity Prediction* (Parker et al, 1986) e *Bepipred Linear Epitope Prediction* (Larsen et al, 2006). Os cálculos dos índices para cada método foram feitos utilizando o software *Antibody Epitope Prediction* disponível no site do *Immune Epitope Database* (IEDB).

Baseando-se nestes parâmetros, selecionou-se dois peptídeos denominadas de E/ENS3 e ENS1/3, correspondentes a dois peptídeos truncados. O peptídeo E/ENS3 corresponde a duas sequências da proteína de envelope (E) e uma sequência da proteína Não Estrutural 3 (NS3). O peptídeo ENS1/3 corresponde a uma sequência da proteína de Envelope (E), uma sequência da proteína Não Estrutural 1(NS1) e uma sequência da proteína Não Estrutural 3 (NS3). Na junção de cada sequência dos peptídeos foram adicionados um link de glicina (3 glicinas) para facilitar o dobramento e possivelmente o reconhecimento dos anticorpos. A cepa de referência utilizada foi DENV I (AF 180817-1).

3.4 Síntese Química dos Fragmentos Gênicos Codificantes para os Peptídeos E/ENS3 e ENS1/3

A partir das sequências mapeadas dos peptídeos denominados E/ENS3 e ENS1/3 foram adquiridos da empresa *GenScript – USA* duas sequências nucleotídicas, uma com 426 *pb* (E/ENS3) e a outra com 327 *pb*, que foram otimizadas para códons preferenciais de *E. coli* antes de serem sintetizadas. Foram adicionados sítios de restrição para *BamHI* e *EcoRI* (Invitrogen, New York, USA) nas duas sequências, na extremidades 5' e 3', respectivamente, para facilitar a clonagem em vetor de expressão procarioto pRSET A (Invitrogen, New York, USA). As sequências foram sintetizadas, clonadas e enviadas pela *GenScript* em vetor *pUC 57* para a Plataforma Técnica do CEPEM.

3.5 Preparo de Células Quimiocompetentes *TOP10F'* (Invitrogen, New York, USA) e *BL - 21 SoluBL21™* (Genlantis - USA)

O preparo de células competentes seguiu a metodologia descrita por Messing (1979). Cepas bacterianas *E. coli* de linhagem *TOP 10F'* (Invitrogen) e *BL 21 SoluBL21™* (Genlantis), estocadas a temperatura -70°C e meio LB/ DMSO 10% (Dimetilsulfóxido) foram descongeladas em gelo e semeadas em placas de petri descartáveis de 90x15 mm, contendo *Luria Bertani* -LB/ágar a 1.5%. Incubou-se a 37°C por 24 horas e em seguida uma colônia de cada cepa foi inoculada em 5 mL de meio *Luria Bertani* (LB) líquido para crescimento durante 18-20 horas a 37°C e em agitação constante (200 rpm/minuto). Posteriormente 1.0 mL destas culturas foram inoculados em 50 mL de meio LB líquido. As cepas de *E. coli TOP 10 F'* sempre foram crescidas em meio contendo tetraciclina (25 $\mu\text{g/mL}$) e *BL 21 SoluBL21™* em clorafenicol (34 $\mu\text{g/mL}$). As culturas foram coletadas em fase exponencial de crescimento

determinada quando a absorbância 600 nm estava entre 0.45 e 0.55. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 4.000 rpm, por 10 minutos a 4°C, e logo suspensas em 0.5 volumes de uma solução de CaCl₂ 50mM estéril gelada. Após 2 horas de incubação em banho de gelo, as bactérias foram centrifugadas na mesma rotação e o sedimento suspenso em 0.8 vol. de tampão FSB (Acetato de potássio 10 mM; pH 7.5; MnCl₂.4H₂O 45 mM; CaCl₂.2H₂O 10 mM; KCl 100 mM; Glicerol 10%). Para armazenamento foram adicionados 10% de DMSO e a preparação distribuída em alíquotas de 200 µL em tubos tipo eppendorf de capacidade de 0,6 mL previamente resfriados, sendo congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente estocadas à temperatura de -70°C até o uso.

3.6 Extração do DNA Plasmidial (Miniprep) dos Clones pUC 57 E/ENS3 e ENS1/3

Os plasmídeos com as informações gênicas para expressão dos peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 sintetizados pela empresa *GenScript – USA* foram enviados na concentração de 4 ng, liofilizados e posteriormente solubilizados em 10 µL de água ultra pura (Tipo I). Uma alíquota de 0,2 µL de cada um dos vetores foram utilizadas para transformação das células competentes *E. coli TOP 10F'* (Invitrogen, New York, USA). As colônias resultantes da transformação foram selecionadas em placas LB/Agar/Ampicilina (100µg/mL), e processadas para isolamento de DNA plasmidial.

Do total de ± 200 colônias transformadas, uma de cada (pUC 57 E/ENS3 e pUC 57 ENS1/3) foram inoculadas em 2 mL de meio LB/ampicilina (100µg/mL) a 37°C por 18 horas, sob agitação constante (200 rpm/minuto). Em seguida os plasmídeos foram extraídos usando o procedimento de *Miniprep*. Para purificação do DNA plasmidial utilizou-se o kit QIAprep Spin Miniprep (Quiagen®-USA) em que 1,5 mL de cada inóculo foi centrifugado por 1 minuto e descartado o sobrenadante, as cepas foram suspensas em 250µL de tampão P1,

adicionados 250µL de tampão P2 e após misturar cuidadosamente, foi adicionado 350 µL de tampão N3. Após inverter 5 vezes o tubo, o material foi centrifugado (13,000rpm) por 10 minutos e o sobrenadante aplicado em uma coluna com tubo coletor. A coluna foi lavada adicionando 0,75mL de tampão PE e centrifugada por 1 minuto, em seguida o líquido do tampão coletor foi retirado e a coluna centrifugada por mais 1 minuto. Os clones foram eluídos com 50µL de tampão ED (Tris 10mM, pH8,5), incubados por 1 minuto e em seguida centrifugados por 1 minuto.

3.7 Análise do DNA Plasmidial através de Enzimas de Restrição *BamHI* e *EcoRI* (Invitrogen, New York, USA)

Para confirmação dos insertos de tamanhos correspondentes aos genes E/ENS3 e ENS1/3 extraídos pela metodologia de *Miniprep*, foram utilizadas as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI* (Invitrogen, New York, USA). Em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 5 µL do produto de miniprep ($\pm$ 500 ng), 1µL de tampão 3, 10X, 10U de *BamHI* (Invitrogen, New York, USA) e 6U de *EcoRI* (Invitrogen, New York, USA), água q.s.p 10µL e em seguida a mistura foi incubada à 37°C por 2 horas.

3.8 Análise Eletroforética dos Produtos de Digestão do Vetor de Clonagem pUC-57 com Enzimas de Restrição *Bam HI* e *Eco RI*

Para confirmar a liberação dos insertos dos plasmídeos pUC-57 E/ENS3 e pUC57 ENS1/3, os produtos das digestões foram aplicados em gel de agarose à 2,0% e corados com *GelRed* 0,005% (*Uniscienze, BRA*). Após eletroforese, os produtos de digestão foram então levados à luz ultravioleta e comparados a um marcador de 100 pb (Invitrogen, New York,

USA) para análise relativa ao tamanho corresponde ao vetor, aproximadamente 2.7 kb, e aos fragmentos clonados com tamanho correspondente às regiões E/ENS3 e ENS1/3, respectivamente 426 pb e 327 pb, visualizados em transluminador UV.

3.9 Purificação dos Fragmentos Utilizando “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (Quiagen®-USA)

As bandas correspondentes aos genes quiméricos E/ENS3 e ENS1/3 foram seccionadas do gel de agarose, com auxílio de uma lâmina de bisturi, transferidas para dois tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL, adicionados 300µL de “*QG Solubilization buffer*” em cada, em seguida incubados à temperatura de 50°C em termobloco por 5 minutos até solubilização completa da agarose. Posteriormente foram adicionados 150µL de álcool isopropílico e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Todos o volumes foram adicionados na coluna fornecida no kit, centrifugados por 1 minuto a 8000 rpm. Cada filtrado foi descartado e a coluna lavada com 750µL de “*Buffer PE Wash*” e realizada uma nova centrifugação à 8000 rpm por 1 minuto. Os filtrados foram descartados e dois novos tubos *ependorfs* de 1,5 mL foram identificados e as colunas foram transferidas para filtrar e em seguida eluída em 40 µL de “*Buffer EB Elution buffer*”. Os produtos da purificação E/ENS3 e ENS1/3 foram aplicados em gel novamente como no item 3.8 para confirmar as purificações. O vetor pRSET A foi digerido e purificado paralelamente aos genes sintéticos.

3.10 Ligação dos Fragmentos Gênicos E/ENS3 e ENS1/3 em Vetor de Expressão pRSET A (Invitrogen - New York-USA)

Os produtos da purificação foram ligados ao vetor de expressão procarioto pRSET A (Invitrogen - New York-USA) (Figura 08) para clonagem. O vetor pRSET A foi digerido com *Bam HI* e *Eco RI* (Invitrogen - New York-USA) para formar extremidades coesivas compatíveis para ligação na fase de leitura correta dos fragmentos E/ENS3 e ENS1/3. Foram adicionados 2,5 µL do tampão 2,5x, 10U de T4 DNA ligase (Promega - USA), 1,5µl do vetor pRSET A e 1,5 µL de Inseto E/ENS3 e ENS1/3. As ligações foram incubadas em tubos *eppendorfs* por 1 hora à temperatura ambiente e, em seguida, estocadas à temperatura de -20 °C.

3.11- Expressão dos Fragmentos Gênicos E/ENS3 e ENS1/3 em Vetor Procarioto pRSET A (Invitrogen- New York-USA)

Para confirmar a clonagem dos fragmentos gênicos *E/ENS3* (427 pb) e *ENS1/3* (326 pb) em vetor de expressão pRSET A (Invitrogen - USA), os vetores foram digeridos com enzimas de restrição *Bam HI* e *Eco RI* e os produtos analisados em gel de agarose com liberação dos fragmentos de 427 pb e 326 pb. Os plasmídeos pRSETAE/*ENS3* (427 pb) e pRSETAENS1/3 (326 pb) foram transformados, como no item 3.6, utilizando células quimiocompetentes SoluBL21™ (Genlantis - USA), plaqueadas em LB/Agar com ampicilina (100µg/mL) e incubadas por 12 horas à 37°C. Uma colônia de cada placa com os plasmídeos recombinantes foram inoculadas em dois *erlemeyer* de 20 mL com 5mL de meio LB líquido com ampicilina na concentração de 100 µg/mL e clorafenicol 34 µg/mL, durante a noite à 37 °C e sob agitação de 200 rpm. No dia seguinte, 1mL dos inócuos pRSETAE/*ENS3* (427 pb) e

pRSETA_{ENS1/3} foram repassados para 4 *erlemeyers* de 1 L com 300 mL de meio LB com ampicilina 100µg/mL e clorafenicol 34 µg/mL. Os materiais foram incubados novamente, a mesma temperatura e rotação, até o crescimento atingir entre 0,5 a 0,6 D.O (600 nm) após leitura. A expressão dos peptídeos recombinantes foram induzidas com isopropil-beta-D-thiogalactopiranoside (IPTG) na concentração de 0,4 mM/mL com ajuste da temperatura para 20° C por 24 horas. Do total de 4 erlemeyers, dois foram utilizadas como controles negativos, sem adição de IPTG.

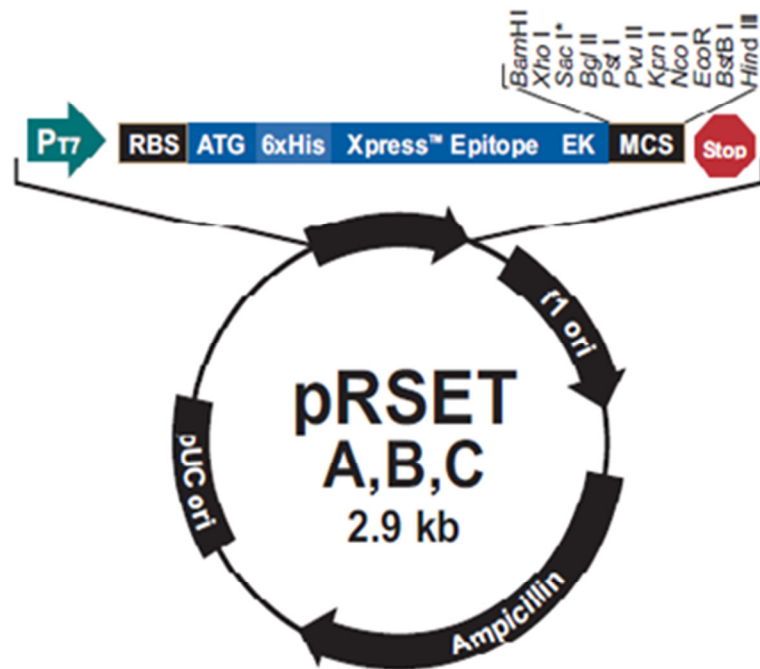


Figura 08- Representação esquemática de vetor de expressão procarioto pRSET A (Invitrogen- New York-USA) utilizados para expressão dos peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 recombinantes

3.12 Expressão dos plasmídeos pRSETAE/ENS3 (427 pb), pRSETAENS1/3 e Visualização por SDS-PAGE

Os imunoprecipitados oriundos dos extratos celulares e sobrenadantes das culturas transformadas com pRSETAE/ENS3 (427 pb) e pRSETAENS1/3 de células *BL 21 SoluBL21*TM (Genlantis - USA) foram avaliados quanto ao seu perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Sambrook *et al*, 1989). Os imunoprecipitados já suspensos em solução tampão redutora e fervidos a 100°C por 5 minutos e o marcador de peso molecular de proteínas (“Molecular WeightMarker”, Sigma-Aldrich, Alemanha) foram aplicados no gel de poliacrilamida 15% e a eletroforese foi conduzida em solução tampão de corrida (Tris 25 mM; EDTA 1,95 mM; glicina 0,12 M; SDS 0,1% pH 8,3) a uma voltagem constante de 100V durante 2 horas. As bandas proteicas foram visualizadas através da coloração pelo método de *Coomassie blue*. Após a separação eletroforética das proteínas e coloração, as bandas protéicas obtidas foram submetidas a foto documentação com o “software” Image J (Image Analysing Software, Alemanha).

3.13 Purificação dos Peptídeos E/ENS3 (17 kDa) e ENS1/3 (15 kDa) e Western Blott

As colônias transformadas expressaram os dois peptídeos com o padrão de migração eletroforético compatível com o tamanho de 17 e 15 kDa, porém predominaram na fração insolúvel sob forma de corpúsculo de inclusão, sendo estes solubilizados usando um agente caotrópico, uréia 8M.

Na tentativa de favorecer a expressão dos peptídeos recombinantes nas suas formas solúveis, algumas modificações foram empregadas ao protocolo original, dentre elas a

diminuição da temperatura de expressão, alteração na concentração do agente indutor e a adição de diferentes agentes solubilizadores. No entanto, nenhuma modificação empregada foi capaz de promover a solubilização.

A purificação, então, foi realizada em larga escala sob condições desnaturantes (tampão contendo 8M de uréia), uma vez que a proteína de interesse encontrava-se em corpos de inclusão. Os extratos resultantes, após a lise e clarificação, foram incubados com resina Ni-NTA-Agarose para que os peptídeos portadores da cauda de seis histidinas ficassem imobilizados na resina, seguidos de eluição e diálise com PBS 7,4. As purificações foram quantificadas pela metodologia de Bradford, utilizando uma curva padrão com BSA após diálise em tampão PBS 7,4.

3.14 Immunoblot

Após a eletroforese em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-PVDF, Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) em um tampão transferência utilizando-se um aparato de transferência para Western blot (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ), por 3 horas a 90mA. Em seguida, as membranas foram coradas com solução de Ponceau por 3 minutos e lavadas com água deionizada para certificar a presença de proteínas na membrana. As membranas, então, foram bloqueadas com tampão PBS-Tween contendo leite a 5%, por 45 minutos, à temperatura ambiente (TA) sob agitação e lavadas em PBS-Tween 0,05% por 2 vezes. A detecção dos peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 foi realizada através do anticorpo *anti-his tag* (Aldrich-Sigma - USA), na diluição de 1:2500 em PBS-Tween 0,05%, por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação. As membranas foram então lavadas 3 vezes em PBS-Tween 0,05% por 10 minutos cada e incubadas em um anticorpo secundário anti-mouse IgG, conjugado com peroxidase, na diluição de 1:5000

(Molecular Probes, Eugene, Oregon), em PBS-Tween, por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,05% por 7 minutos e reveladas com uma solução de OPD (ortofenilenodiamina) (Sigma – USA), preparada em tampão citrato-fosfato, acrescentado de 0,001% de H₂O₂ e Incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente.

3.15 Quantificação das Proteínas E/ENS3 (17 kDa) e ENS1/3 (15 kDa) - Método de Bradford

A dosagem das proteínas foram realizadas pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976) que baseia-se na formação de complexos entre o corante *Coomassie Blue* com a cadeia polipeptídica. Um volume de 0,5 - 5mL dos extratos proteicos, obtidos das culturas foram utilizados para a quantificação. As amostras em duplicata foram colocadas em tubos de ensaio onde foi adicionado 1,0 mL de NaCl 0,15M e 1,0 mL do reagente de Bradford em cada amostra. A mistura foi incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Kinects/Endpoint System Analyser - Hitashi - JAPAN) no comprimento de onda de 595nm. A concentração das proteínas foram calculada através de uma curva de diluição padrão de soro de albumina bovina 1mg/ml (BSA) com 1, 3, 5 e 7 mg, conforme curva padrão utilizada para quantificação pelo método de Bradford (Figura 09).

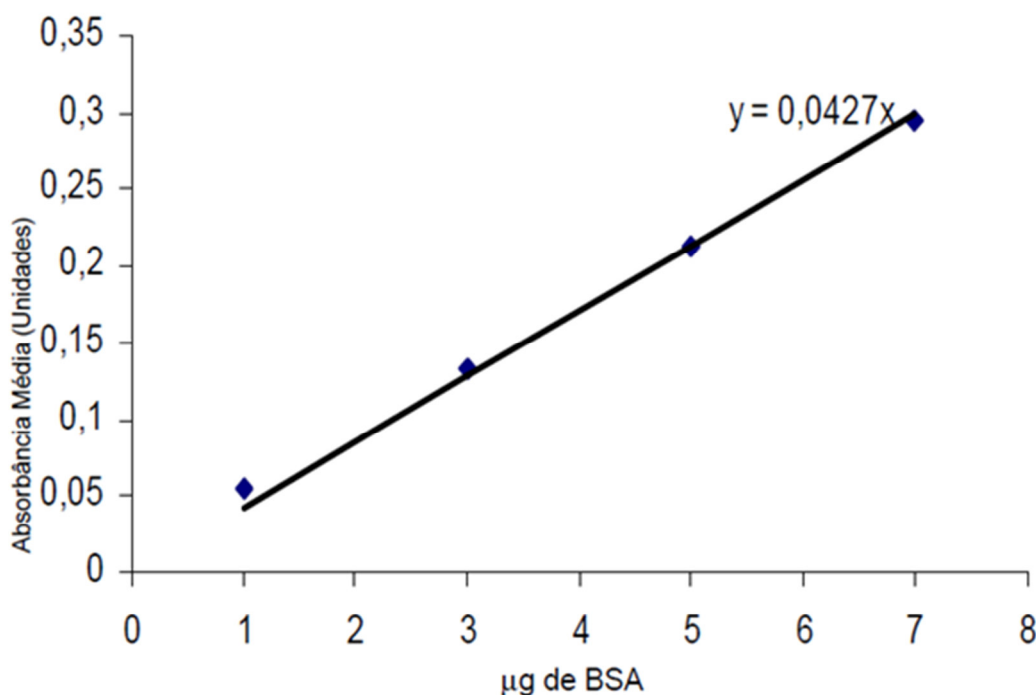


Figura 09- Curva padrão de BSA 1mg/mL utilizada para quantificação das proteínas E/ENS3 e ENS1/3 ($R^2 = 0,9942$).

3.16 Utilização dos Peptídeos E/ENS3 (17 kDa) e ENS1/3(15 kDa) em ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) Indireto.

Para detecção de anticorpos IgG e IgM específicos anti-dengue nos soros controles positivos e negativos, as placas de ELISA foram sensibilizadas separadas com 100 µL (10µg/mL de peptídeos *E/ENS3* e *ENS1/3* em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6) durante a noite a 4°C. Foi descartado o sobrenadante no dia seguinte e as placas foram bloqueadas com 200 µL de solução de bloqueio (5% leite desnatado em solução de PBS 1x, pH 7,4) por duas horas à 37°C, seguido de cinco lavagens com 200 µL com tampão PBS 1x, pH 7,4, tween 0,05%. Os soros dos pacientes foram diluídos 1:100 em tampão PBS 1x, pH 7,4 com 2% leite desnatado, em seguida adicionados 100 µL por poço e incubados à 37°C por 1 hora. As placas foram lavadas novamente por 5 vezes com tampão de lavagem (PBS 1x, pH

7,4, tween 0,05%) e adicionados 100 µL dos conjugados anti-human IgG ou IgM produzidos em cabra, marcados com fosfatase alcalina, diluídos 1:2500 em tampão PBS 1x, pH 7,4 com 2% leite desnatado e incubados à 37°C por 1 hora. Os poços foram lavados como nas etapas anteriores e adicionados 50 µL de solução substrato (p-NitrophenilPhosphate - Sigma - USA), incubados por 25 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi bloqueada com 50 µL de solução NaOH 2M, seguido de leitura de ELISA em 405 nm.

3.17 Cálculos Estatísticos

Os cálculos de sensibilidade (Se), especificidade (Sp), valor preditivo positivo (Vpp), valor preditivo negativo (Vpn) e Cut Off foram calculados usando o Microsoft Excel 2010. Os resultados do *MAC-ELISA IgM (Pan-Bio-Australia)* e *Dengue Duo Teste ELISA Captura para IgG & IgM (Sanofi)* foram o padrão para comparação como nosso teste de ELISA indireto.

3.18 Aspectos Éticos

Os painéis sorológicos contendo amostras comprovadamente positivas e negativas para dengue foram obtidos a partir de amostras humanas disponibilizadas pelo LACEN/RO. As amostras utilizadas foram materiais de descarte, pois após 180 dias as amostras positivas e negativas são descartadas. Todos os dados foram tratados de forma confidencial e anônima.

A utilização das amostras nos ensaios foi viabilizada pela aprovação no Comitê Nacional de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CONEP), Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, sob registro nº 12138.

IV- RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Resultados das Análises de Bioinformática

4.1.1 Definição das Sequências Lineares de aa das Proteínas de Envelope (E), Não Estrutural 3 (NS3) e Não estrutural 1 (NS1) do DENV para Seleção dos Peptídeos E/ENS3 e ENS1/3

As regiões das proteínas de Envelope (E), Não Estrutural 3 (NS3) e 1 (NS1) foram selecionadas conforme características previamente definidas: (1) Acessibilidade a superfície, (2) hidrofiliicidade e (3) predição de epítomos lineares.

Para a composição do peptídeo denominado de E/ENS3, foram identificadas e selecionadas duas sequências repetidas da proteína de Envelope (132 -176), nomeadas como **1a** e **1b** (Figura 10 A) e uma terceira sequência da proteína NS3 (560 – 601) nomeada como **1c** (Figura 10 C). Para definição do peptídeo denominado de ENS1/3, foram identificadas e selecionadas uma sequência da proteína de E (388 – 419) nomeada como **2a** (Figura 10 A), outra sequência da NS1 (10 – 40) nomeada como **2b** (Figura 10 B) e uma terceira sequência da proteína NS3 (370 – 405), nomeada como **2c** (Figura 10 C). Cada peptídeo é composto por três regiões (fragmentos a, b e c) intercaladas por três resíduos de glicinas para facilitar a dobradura.

4.1.2 Sequências Lineares de Aminoácidos da Proteína E, Não Estrutural 3 (NS3) e Não estrutural 1 (NS1) dos Peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 do DENV

Após a seleção das sequências de aminoácidos das três proteínas (E, NS1 e NS3), dois peptídeos foram identificados e denominados E/ENS3 e ENS1/3. O peptídeo E/ENS3, com peso molecular de ± 17 kDa, resultou de duas sequências repetidas de 45 aa da proteína E e uma sequência de 42 aa da proteína NS3 (Tabela 3). O peptídeo ENS1/3 resultou de uma sequência de 32 aa da proteína E, uma sequência de 30 aa da proteína NS1 e uma sequência de 35 aa da proteína NS3 com peso molecular de ± 15 kDa. (Tabela 4). Para dar flexibilidade aos peptídeos foram adicionados links de glicina (3 glicinas), nas junções dos peptídeos.

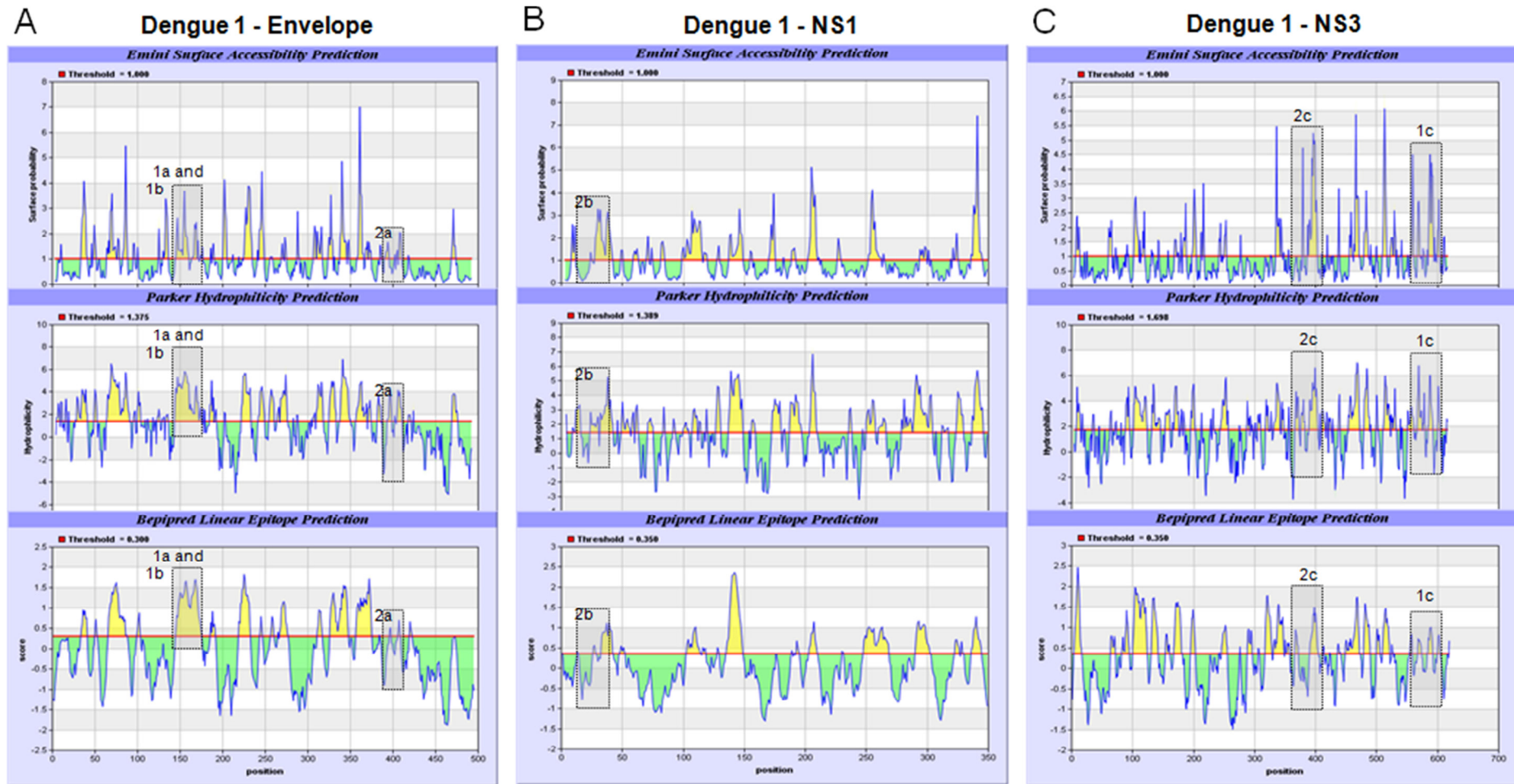


Figura 10- Análises das sequências lineares das proteínas E (A), NS1 (B) e NS3 (C). Seleção dos fragmentos realizada pela combinação dos quatro métodos de análises: *Surface Accessibility Prediction*, *Flexibility Prediction*, *Hydrophilicity Prediction* e *Bepipred Linear Epitope Prediction*. Na figura A análise da proteína de Envelope (E) mostrando as regiões que foram selecionadas (1a e 1b e 2a) levando em consideração acessibilidade à superfície, hidrofiliicidade e predição de epítopos lineares. A figura B e C analisa os mesmos parâmetros, mostrando as regiões da proteína NS1 (2b) e NS3 (1c e 2c). Foi utilizada a cepa de referência *GenBank AF 180817_1 DENV*.

Tabela 03- Localização, número e sequência de aa dos peptídeos das proteínas de Envelope (E) e Não estrutural 3 (NS3) do peptídeo denominado E/ENS3. As sequências de aa em azul correspondem aos peptídeos da proteína de Envelope, a sequência de aa em laranja ao peptídeo da proteína NS3 e as sequências de aa em vermelho correspondem aos links de glicina.

Localização AF 180817_ DENV 1 GenBank	Número de aa/ Massa	Sequência de aa do Peptídeo E/ENS3
Envelope 132 a 176	45	YENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAP TSEIQLT
Envelope 132 a 176	45	YENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAP TSEIQLT
NS3 560 a 601	42	DRRWCFDGERNNQVLEENMDVEIWTKEGERKKLRPR WLDART
Peptídeo Completo E/ENS3	138 (17 kDa)	YENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAP TSEIQLTGGGYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEH GTTATITPQAPTSEIQLTGGGDRRWCFDGERNNQVLEE NMDVEIWTKEGERKKLRPRWLDART

Tabela 04- Localização, número e sequência de aa dos peptídeos das proteínas de Envelope (E), Não estrutural 1 (NS1) e Não estrutural 3 (NS3) do peptídeo denominado ENS1/3. A sequência de aa em azul corresponde ao peptídeo da proteína de Envelope, a sequência de aa em verde ao peptídeo da proteína NS1, a sequência de aa em laranja ao peptídeo da proteína NS3 e as sequências de aa em vermelho correspondem aos links de glicina.

Localização AF 180817_1 GenBank	Número de aa/ Massa	Sequência de aa do Peptídeo ENS1/3
Envelope 388 a 419	32	KLSWFKKGSSIGKMFATARGARRMAILGDTA
NS1 10 a 40	30	GRELKCGSGIFVTNEVHTWTEQYKFQADSPK
NS3 370 a 405	35	NDIANCLRKNKGKRVVQLSRKTFDTEYQKTKNNDWDY
Peptídeo Completo ENS1/3	103 (15 kDa)	KLSWFKKGSSIGKMFATARGARRMAILGDTAGGGG RELKCGSGIFVTNEVHTWTEQYKFQADSPKGGGNDIA NCLRKNKGKRVVQLSRKTFDTEYQKTKNNDWDY

4.2 Sequências Quiméricas dos Genes Codificantes *E/ENS3* (426 pb) e *ENS1/3* (327 pb)

Após definição dos peptídeos *E/ENS3* e *ENS1/3*, por ferramentas de bioinformática, foram definidas sequências nucleotídicas otimizadas para expressão em sistema procarioto dos dois peptídeos, definidas como *E/ENS3* e *ENS1/3*, resultando em sequências de DNA de 426 pb e 327 pb respectivamente (Tabela 5). As sequências genômicas foram sintetizadas e clonadas em vetor pUC 57 pela empresa *GenScript - USA*. Para posterior clonagem em vetor de expressão procariótico pRSET A (*Invitrogen, New York, USA*), foram inseridos sequências com sítios de enzimas de restrição para orientar a direção da clonagem e facilitar a inserção destes fragmentos na fase de leitura do vetor. Na extremidade 5' foi adicionado o sítio de *Bam HI* e na extremidade 3' o sítio de *Eco RI* (Tabela 5). O desenho esquemático da construção das duas sequências genômicas em vetores pUC 57 estão representados na figura 11 e 12.

Tabela 05- Sequências dos genes quiméricos *E/ENS3* e *ENS1/3* otimizadas para expressão em procariotos. Em vermelho está representado o sítio de *Bam HI* e em azul está representado o sítio de *Eco RI*.

Gene	Sequências Otimizadas	Tamanho (pb)
E/ENS3	GGATCC TATGAAAACCTGAAATATAGCGTGATTGTGACCGT GCATACCGGCGATCAGCATCAAGTGGGCAACGAAACCACC GAACATGGCACCACCGCGACCATTACCCCGCAGGCGCCGA CCAGCGAAATTCAGCTGACCGGCGGCGGCTACGAAAATCT GAAATACTCTGTTATCGTTACGGTTCACACGGGTGACCAAC ACCAAGTTGGTAATGAAACGACGGAACATGGCACCACCGC AACCATTACCCCGCAGGCACCGACGTCTGAAATTCAGCTG ACCGGTGGTGGTGATCGTCGTTGGTGCTTTGATGGCGAACG TAACAACCAGGTGCTGGAAGAAAACATGGATGTGGAAATT TGGACCAAAGAAGGCGAACGTAAAAAACTGCGTCCGCGTT GGCTGGATGCGCGTACCG GAATTC	426
ENS1/3	GGATCC AAACTGAGCTGGTTTAAAAAAGGCAGCAGCATTG GCAAAATGTTTGAAGCAACCGCACGTGGTGCGCGTCGTAT GGCAATTCTGGGTGATACCGCAGGTGGAGGTGGTCGTGAA CTGAAATGCGGCAGCGGCATTTTTGTGACCAACGAAGTGC ATACCTGGACCGAACAGTATAAATTTAGGCGGATAGCCC GAAAGGCGGCGGCAACGATATTGCGAACTGCCTGCGTAAA AACGGCAAACGTGTGGTGCAGCTGAGCCGTAAAACCTTTG ATACCGAATATCAGAAAACCAAAAACAACGATTGGGATTA TGAATTC	327

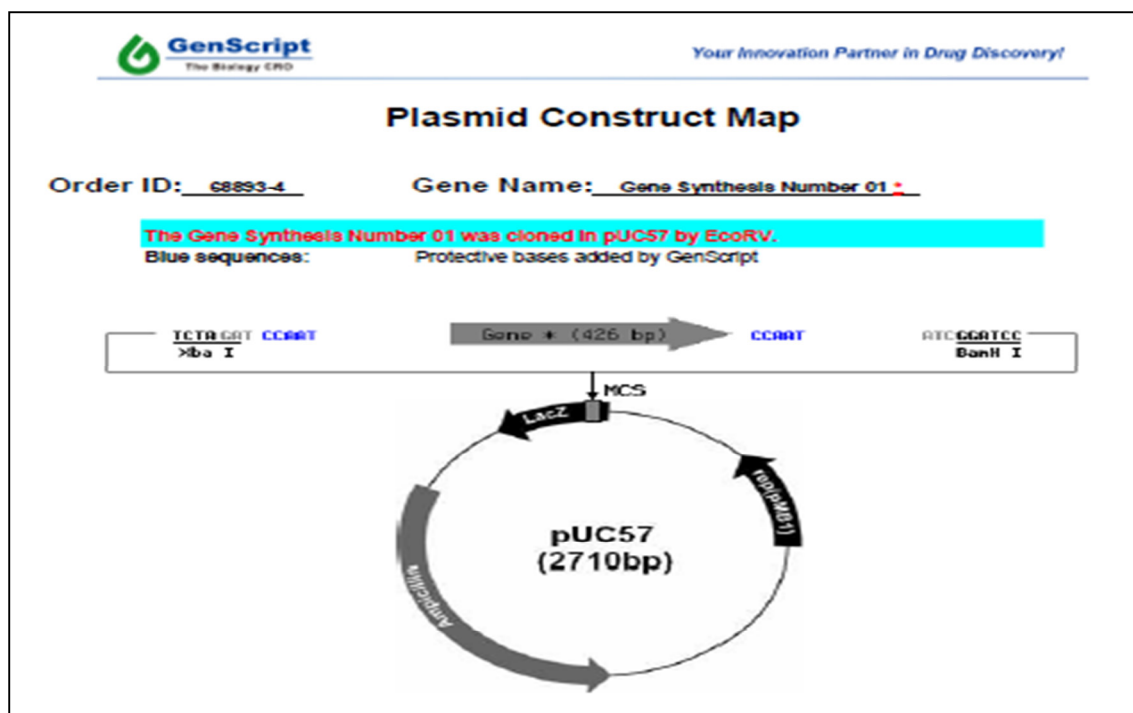


Figura 11- Esquema do vetor de clonagem pUC 57 com local da inserção do fragmento nucleotídeo codificante para o peptídeo EE/NS3 (426 pb)

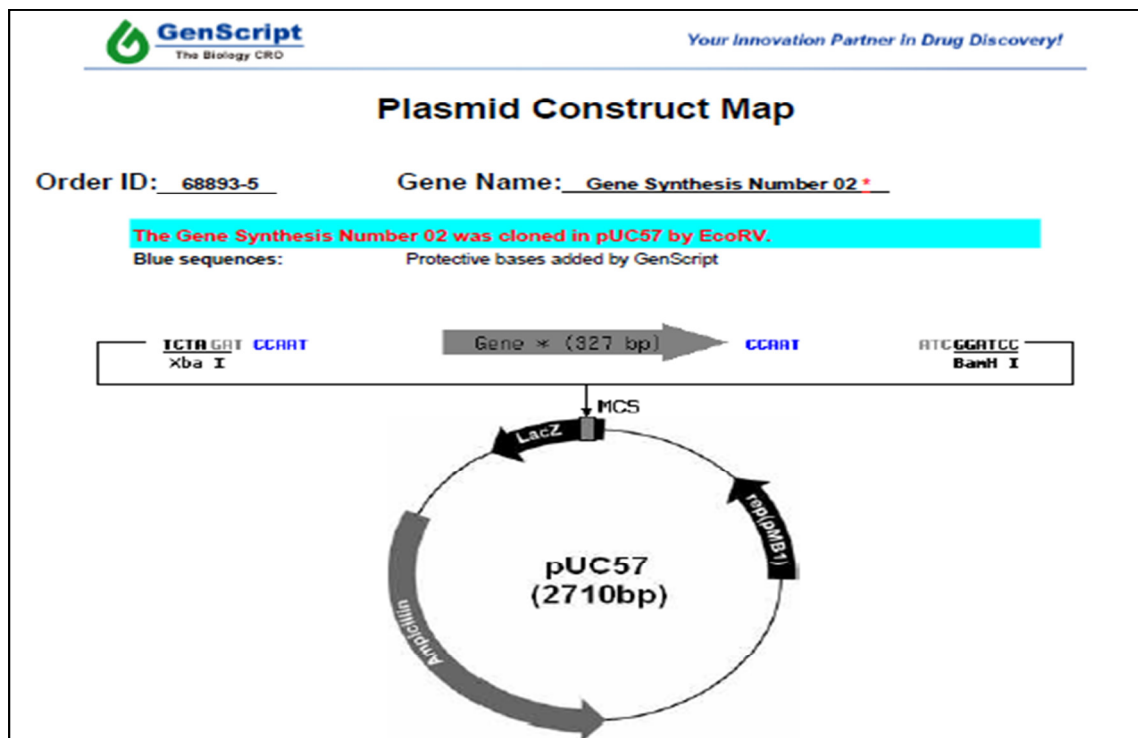


Figura 12- Esquema do vetor de clonagem pUC 57 com local da inserção do fragmento nucleotídeo codificante para o peptídeo ENS1/3 (327pb)

4.3 Digestão com *Bam* HI e *Eco* RI dos Plasmídeos pUCE/ENS3 e pUC/ENS1/3

Os plasmídeos sintetizados pela empresa *GenScript-USA*, liofilizados e quantificados em 4ng foram ressuspensos em 10 μ L de Tipo I. Uma alíquota de 0,2 μ L de cada plasmídeo foi replicado em células competentes (TOP 10 F' - Invitrogen, New York, USA) e feita extração por *Miniprep*. Os produtos das digestões dos plasmídeos com *Bam* HI e *Eco* RI foram aplicadas em gel de agarose 2,0% e corados com *GelRed*® para confirmação (Figura13). A digestão do pUC 57 E/ENS3 liberou fragmento de 426 pb e a digestão do pUC E/ENS1/3 liberou fragmento de 327 pb.

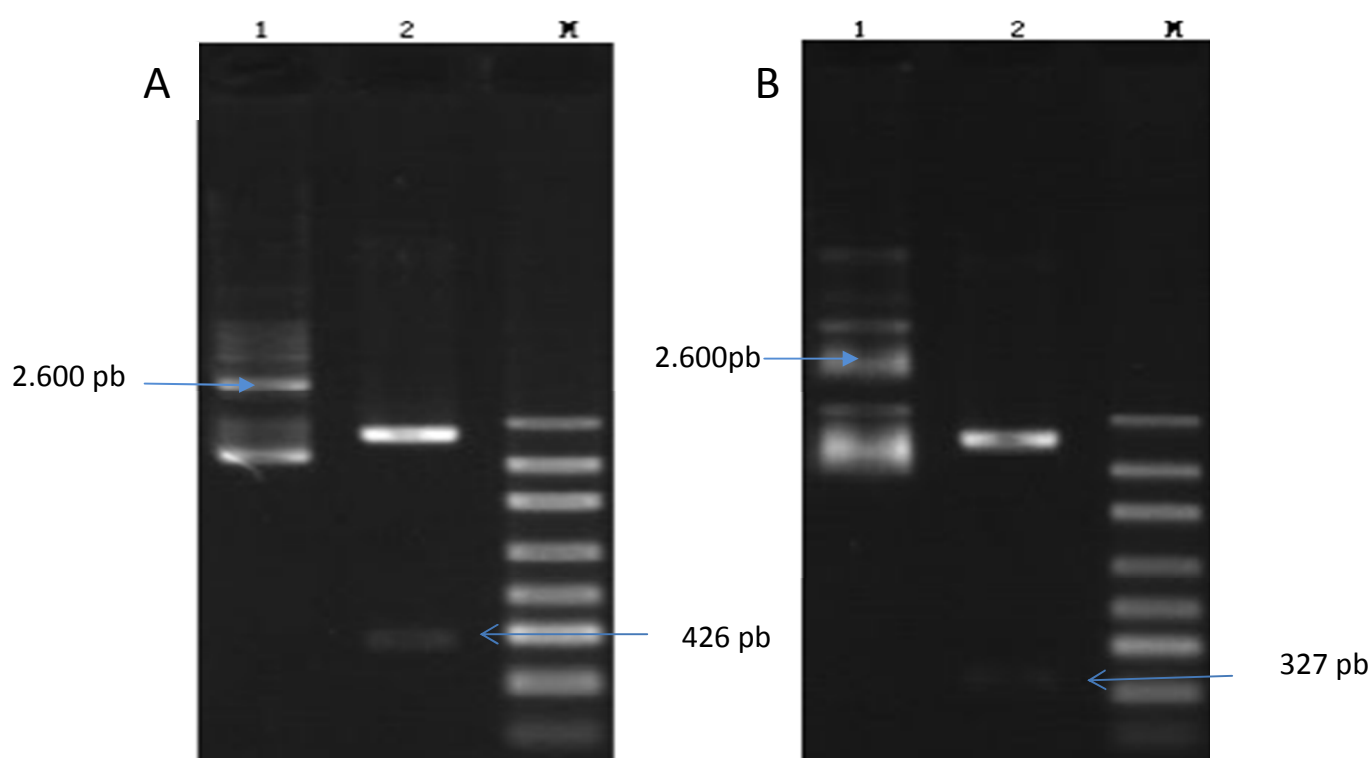


Figura 13- Análise da digestão dos plasmídeos recombinantes pUC 57 E/ENS3 (A) e pUC E/ENS1/3 (B). Em A a coluna 1 é o vetor não digeridos (2.600 pb), a coluna 2 é o vetor digerido onde pode ser observado o fragmento de 426 pb e a coluna x é o marcador de peso molecular de 100 pb. Em B a coluna 1 é o vetor não digeridos (2.600 pb), a coluna 2 é o vetor digerido onde pode ser observado o fragmento de 327 pb e a coluna x é o marcador de peso molecular de 100 pb.

Para confirmação da expressão dos peptídeos E/ENS3 e ENS1/3, após eletroforese em gel de SDS PAGE, os peptídeos foram transferidos para uma membrana de imunoblotting, corada com azul de Coomassie, para revelação com anticorpo monoclonal anti his tag (1:2500). As colunas 1 e 3 revelaram os fragmentos correspondentes aos peptídeos ENS1/3 e E/ENS3 respectivamente (Figura 14).

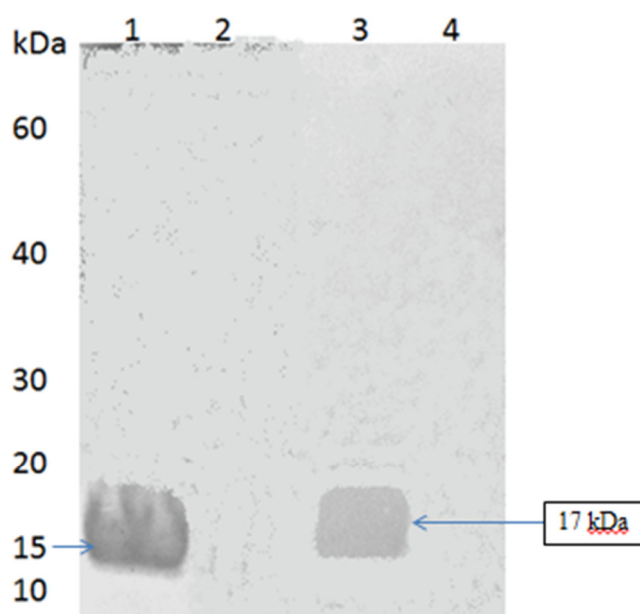


Figura 14- Análise dos peptídeos ENS1/3 e E/ENS3 por *Western blotting*. Coluna 1: Peptídeo ENS1/3 (15 kDa), coluna 2: controle negativo, coluna 3: peptídeo E/ENS3 (17 kDa) e coluna 4: controle negativo.

4.4 - Utilização dos peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 como antígenos em ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) indireto

Os 720 soros com diagnóstico de dengue (IgG ou IgM +/-) de pacientes da soroteca do CEPEN e já testados por outros testes imunoenzimáticos comercialmente disponíveis, foram testados por ELISA Indireto. Os peptídeos E/ENS3 e ENS1/3, foram utilizados na concentração final de 1 µg por poço de cada antígeno, sendo utilizada a mesma metodologia para pesquisa de anticorpos da classe *IgG* ou *IgM*. O *Cut-off* para comparação dos resultados

positivos e negativos para os peptídeos, foi calculado a partir da média das Densidade Ótica (DO) (405nm) dos soros negativos mais 3 vezes o Desvio Padrão (DP). Amostras de soros sabidamente negativas ou positivas foram utilizadas para o cálculo do *cut-off*, sendo para IgG 0,508 e IgM 0,290 (Gráfico 01 e 02).

Para padronização dos testes, foram inicialmente testados os peptídeos EE/NS3 e ENS1/3 isolados e em seguida juntos em cada poço. Foram utilizadas concentração de 1 µg de cada peptídeo solubilizados em tampão Carbonato-Biocarbonato 0,05 M pH 9,6 para anticorpos de classe IgG ou IgM. Os resultados foram melhores quando utilizados os dois peptídeos em cada poço (Tabela 06 e 07).

O resultado dos cálculos estatísticos encontram-se nas tabelas 08 e 09. Na tabela 08 encontra-se os valores de sensibilidade (66,7%), especificidade (91,5%), probabilidade pré-teste (64,2%), valor preditivo positivo (93,3%) e valor preditivo negativo (59,8%) para pesquisa de anticorpos da classe IgG utilizando os peptídeos E/ENS3 e EENS1/3 do total de 363 amostras, sendo 223 positivas e 130 negativas. Os valores $a = 153$, $b = 11$, $c = 80$ e $d = 119$. Quanto a tabela 09, encontra-se os valores de sensibilidade (75,7%), especificidade (91,8%), probabilidade pré-teste (65,8%), valor preditivo positivo (94,7%) e valor preditivo negativo (66,3%) para pesquisa de anticorpos da classe IgM utilizando os peptídeos E/ENS3 e EENS1/3 do total de 357 amostras, sendo 2235 positivas e 122 negativas. Os valores $a = 178$, $b = 10$, $c = 57$ e $d = 112$. Os resultado demonstraram maior sensibilidade e especificidade para o teste IgM (75,7% e 91,8% respectivamente).

Quanto ao intervalo de confiança (IC), correspondente à probabilidade de se encontrar o referido resultado em uma população considerando sua amostra, foi de 95% para os dois testes de IgG e IgM.

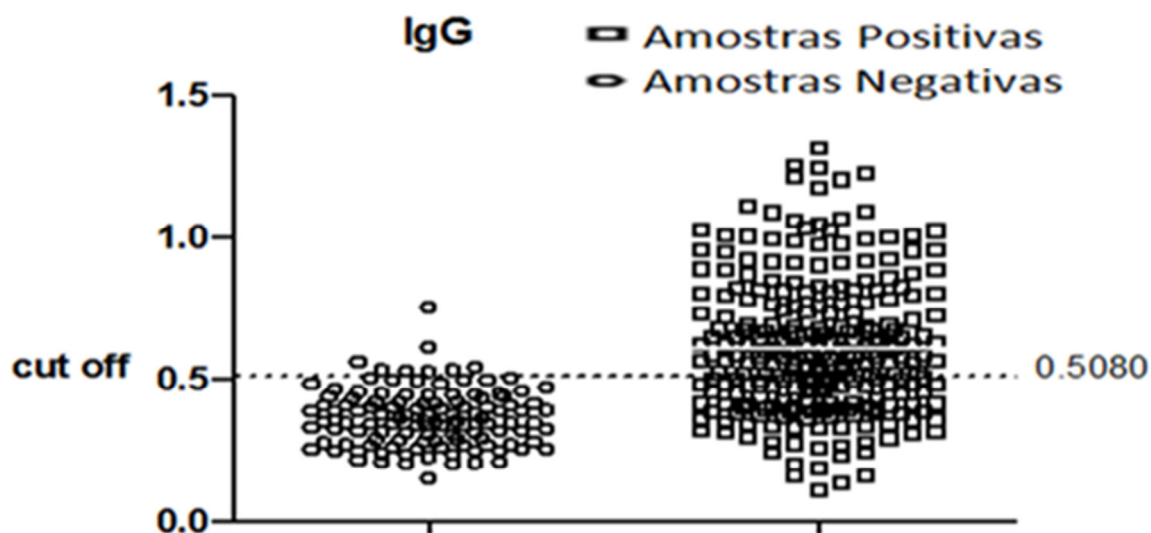


Gráfico 1- Distribuição das leituras (DO) dos controles positivos (○) e negativos (□), absorvâncias em 405 nm obtidas por espectrometria, utilizando o peptídeo E/ENS3 e ENS1/3 como antígeno para pesquisas de anticorpos anti-dengue IgG por ELISA. Cut Off: 0,5080.

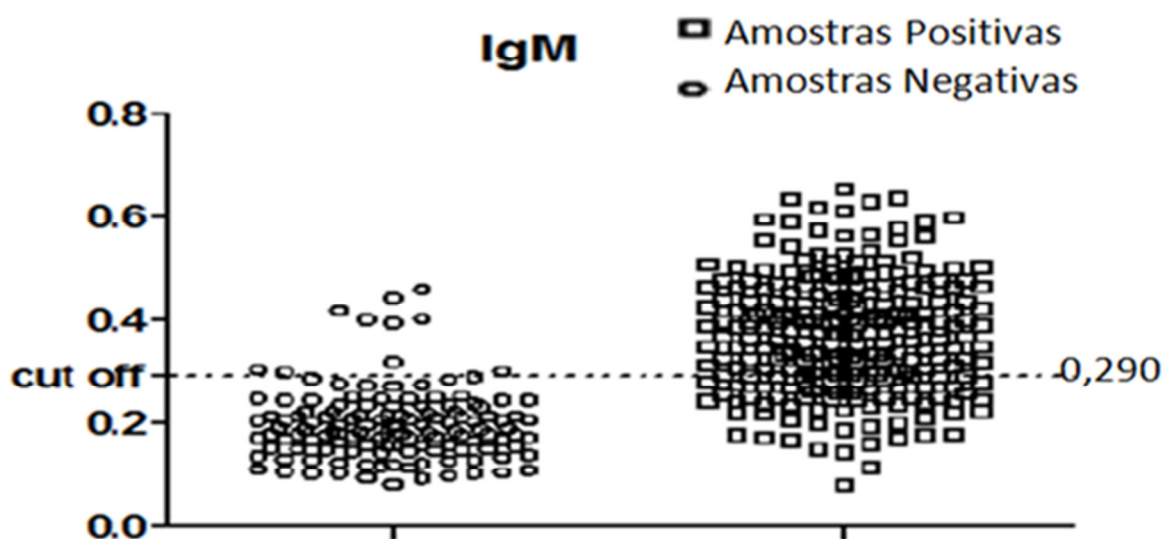


Gráfico 2- Distribuição das leituras (DO) dos controles positivos (○) e negativos (□), absorvâncias em 405 nm obtidas por espectrometria, utilizando o peptídeo E/ENS3 e ENS1/3 como antígeno para pesquisas de anticorpos anti-dengue IgM por ELISA. Cut Off: 0,290.

Tabela 06- Resultado do ELISA Indireto para captura de IgG.

Amostras Biológicas Positivas e Negativas Total 363	Peptídeo E/ENS3 - IgG	Peptídeo ENS1/3 - IgG	Peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 - IgG
233 positivas	123 falsos negativos (52,78%)	104 falsos negativos (44,63%)	80 falsos negativos (34,33 %)
130 negativas	21 falsos positivos (16,15%)	19 falsos positivos (14,61%)	11 falsos positivos (8,46 %)

Tabela 7- Resultado do ELISA Indireto para captura de IgM.

Amostras Biológicas Positivas e Negativas Total 357	Peptídeo E/ENS3 - IgM	Peptídeo ENS1/3 - IgM	Peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 - IgM
235 positivas	6 falsos negativos (9,3%)	4 falsos negativos (6,25%)	57 falsos negativos (24,25 %)
122 negativas	19 falsos positivos (15,57 %)	14 falsos positivos (11,47 %)	10 falsos positivos (8,19 %)

Tabela 08- Resultado das análises estatísticas, utilizando o programa Microsoft Excel 2010, de sensibilidade, especificidade, probabilidade pré-teste, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para pesquisa de anticorpos da classe IgG utilizando os peptídeos E/ENS3 e EENS1/3 do total de 363 amostras, sendo 223 positivas e 130 negativas.

Cálculos estatísticos básicos para Testes Diagnósticos (versão 1999) (Braille, DM & Godoy, MF)						
Teste IgG (+/-)				Padrão	Ouro	
				+	-	
		Teste	+	153	11	164
		diagnóstico	-	80	119	199
				233	130	363
				IC 95%		
% Sensibilidade = a/(a+c)	65,7	%	59,6	71,8		
% Especificidade = d/(b+d)	91,5	%	86,8	96,3		
% Probabilidade pré-teste = (a+c)/(a+b+c+d)	64,2	%	59,3	69,1		
% Valor preditivo positivo = a/(a+b)	93,3	%	89,5	97,1		
% Valor preditivo negativo = d/(c+d)	59,8	%	53,0	66,6		
% Acurácia = (a+d)/(a+b+c+d)	74,9	%	70,5	79,4		
ODDS pré-teste= prob préteste/(1-prob préteste)	1,792					
Likelihood ratio para teste posit=sensib/(100-especif)	7,8					
Likelihood ratio para teste negat=(100-sensib)/especif	0,4					
Estatística Kappa (grau de concordância corrigido)	0,51	0,43 0,60				
(<0,20=pobre;0,21-0,40=fraca;0,41-0,60=moderada; 0,61-0,80=boa;>0,80=muito boa)						

Tabela 09- Resultado das análises estatísticas, utilizando o programa Microsoft Excel 2010, de sensibilidade, especificidade, probabilidade pré-teste, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para de anticorpos da classe IgM utilizando os peptídeos E/ENS3 e EENS1/3 do total de 357 amostras controles, sendo 235 positivas e 122 negativas.

Cálculos estatísticos básicos para Testes Diagnósticos (versão 1999)					
(Braille, DM & Godoy, MF)				Padrão	Ouro
Teste IgM (+/-)			+	-	
	Teste diagnóstico	+	178	10	188
	o	-	57	112	169
			235	122	357
			IC	95%	
% Sensibilidade = $a/(a+c)$	75,7	%	70,3	81,2	
% Especificidade = $d/(b+d)$	91,8	%	86,9	96,7	
% Probabilidade pré-teste = $(a+c)/(a+b+c+d)$	65,8	%	60,9	70,7	
% Valor preditivo positivo = $a/(a+b)$	94,7	%	91,5	97,9	
% Valor preditivo negativo = $d/(c+d)$	66,3	%	59,1	73,4	
% Acurácia = $(a+d)/(a+b+c+d)$	81,2	%	77,2	85,3	
ODDS pré-teste= prob préteste/(1-prob préteste)	1,926				
Likelihood ratio para teste posit=sensib/(100-especif)	9,2				
Likelihood ratio para teste negat=(100-sensib)/especif	0,3				
Estatística Kappa (grau de concordância corrigido)	0,62		0,54	0,70	
(<0,20=pobre; 0,21-0,40=fraca; 0,41-0,60=moderada; 0,61-0,80=boa; >0,80=muito boa)					

V- DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas, os avanços biotecnológicos ocorridos na área diagnóstica das doenças infecciosas e o aumento global de epidemias da dengue aumentaram o número de testes diagnósticos disponíveis comercialmente no mercado. O aumento de oferta tornou crucial a avaliação do desempenho destes testes em diferentes cenários epidemiológicos, de forma a possibilitar uma utilização adequada e racional dos mesmos, mas infelizmente este aumento no número não ocorreu de forma homogênea, exemplo claro disso é o Brasil atualmente não possuir no mercado um kit nacional diagnóstico validado para a dengue, dependendo da importação de insumos ou mesmos kits prontos de países desenvolvidos (SAN MARTÍN e BRATHWAITE-DICK, 2007; GUZMÁN et al., 2010).

Este aspecto foi reforçado pela OMS em 2006 através de uma reunião do *Scientific Working Group on Dengue*, que incluiu entre as prioridades o desenvolvimento e a avaliação de kits diagnósticos visando à melhora do manejo clínico no paciente com a doença (KROEGER et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011). A necessidade de produção de insumos para testes diagnósticos nacionais foi um dos motivos que nortearam a realização deste estudo, onde foram desenhados e testados dois peptídeos truncados a partir de genes sintéticos quiméricos das Proteínas de Envelope (E) e Não Estruturais (NS1 e NS3) do vírus dengue para expressão em sistema procariótico, utilizando o produto da expressão como insumos em um teste imunoenzimático tipo ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti – dengue da classe IgG e IgM de um banco de soros testados previamente para DENV.

O diagnóstico clínico desta doença necessita da confirmação laboratorial por métodos analíticos nas suas várias formas clínicas, pois além de outras doenças febris agudas, os quadros febris hemorrágicas causadas por outros vírus (febre tifóide, febre amarela, hepatites virais, influenza), assim como a malária, leptospirose do tipo anictérico, faringite,

endocardite, doenças causadas por riquetsias, sepse, meningococemia e meningite meningocócica, levam a uma sintomatologia semelhante, podendo dificultar o diagnóstico e levar ao tratamento inadequado. As lesões purpúricas e o choque circulatório só costumam ocorrer em formas graves da doença, após as primeiras 48 horas de sintomatologia (TAVARES e MARINHO, 2005; ALEXANDER et al., 2011). Além disso, a dengue pode ser sub-diagnosticada ou ter seu diagnóstico confundido com o sarampo ou outras doenças exantemáticas, devido à erupção cutânea apresentada pelos pacientes, gerando dificuldades de diagnóstico. O histórico epidemiológico é muito importante para distinguir a dengue da malária, febre amarela e da leptospirose. (TAVARES e MARINHO 2005, HALSTEAD 2006).

Clinicamente, as manifestações variam de uma síndrome viral, inespecífica e benigna, até quadros graves, fatais de doença hemorrágica e choque. Alguns fatores de risco para casos graves são: a cepa do sorotipo viral infectante, o estado imunitário e genético do paciente, a concomitância com outras doenças e a infecção prévia por outro sorotipo viral, estes são os principais fatores relacionados ao surgimento de casos graves e às vezes fatais da doença (SIERRA et al., 2007; BRASIL 2011). Um diagnóstico rápido, preciso e de baixo custo é fundamental para avaliação desta doença principalmente em regiões endêmicas, para a vigilância epidemiológica, para estudos patológicos, clínicos e imunopatológicos da doença. Além disso, a detecção rápida e diferenciação da infecção por DENV na fase inicial permite o tratamento clínico em tempo hábil, monitoramento de casos, investigação etiológica e controle da doença. No caso da dengue é importante considerar o período da doença em que o paciente se encontra para decidir qual o tipo mais apropriado de teste a ser utilizado (detecção de material genético viral, detecção de IgM, detecção de IgG, isolamento viral, detecção de antígeno NS1, entre outros) e fazer uma correta interpretação dos resultados obtidos, sejam eles positivos ou negativos (KAO et al., 2005).

Uma grande barreira encontrada para testar novos antígenos para a dengue é a falta de soros bem caracterizados e em volumes adequados para esses ensaios. Os parâmetros desejáveis seriam soros em duplicata, com RT-PCR positivo e sorotipo caracterizado. Para a dengue é complicado montar uma soroteca com esse perfil, principalmente pela necessidade de soros pareados. No caso de isolamento viral, o ideal é coletar a amostra nos primeiros cinco dias de sintomatologia (TELES et al., 2005), após o décimo dia seria necessário o retorno do paciente a unidade de saúde para coleta de uma segunda amostra. O retorno dos pacientes à unidade de saúde dificilmente ocorre, até por que, clinicamente já estão curados, sendo necessário a busca ativa.

Os soros que foram utilizados nesses ensaios foram definidos como sendo apenas positivos e negativos para anticorpos anti-DENV IgG e IgM. Apesar dessas amostras não serem totalmente caracterizadas, são amostras da região que foram testadas com kits disponibilizados pelo Ministério da Saúde aos LACEN(s) de todo país. Apesar das dificuldades, em parceria com o LACEN/RO, tem-se trabalhado para montagem dessa soroteca com parâmetros aceitos e bem definidos, para ser utilizada em novas pesquisas na área de saúde e também disponibilizar para outros centros de pesquisa que necessitem de amostras de dengue caracterizadas.

Os antígenos expressos em sistema procariótico neste estudo (E/ENS3 e ENS1/3) foram selecionados a partir de genes quiméricos da proteína Estrutural do Envelope (E) viral e Não Estruturais 1 e 3 (NS1 e NS3). Visando a produção insumos para um teste diagnóstico que inicialmente defina como sendo positivo ou negativo para dengue, sem definição de sorotipo, foram selecionadas durante o mapeamento de epítomos por ferramentas de bioinformática, sequências de aminoácidos *consensus* entre as proteínas citadas acima que são comuns entre os 4 sorotipos do dengue. As sequências foram selecionadas conforme as características de antigenicidade, hidrofiliidade e predição de epítomos lineares das proteínas

em estudo (Figura 10), resultando dessa análise os genes quiméricos E/ENS3 com 426 pb (Tabela 05) que expressa um peptídeo de 17 kDa (tabela 03) e o ENS1/3 com uma sequência gênica de 327 pb (tabela 05), que expressa um peptídeo de 15 kDa (Tabela 04).

Visando aumentar a flexibilidade entre os peptídeos que compõem E/ENS3 e ENS1/3 foram adicionamos os códons GGG (Tabela 03 e 04) nas sequências gênicas, que ao serem expressos produzem um link de três glicinas entre os peptídeos que compõem cada fragmento, dando flexibilidade às estruturas finais. Classicamente a glicina é um aminoácido que tem como características inibir a formação de hélices alfa, mas facilita a formação de folha beta na estrutura secundária de proteínas por ser um aminoácido que apresenta um alto grau de flexibilidade quando integrado numa cadeia polipeptídica (KOOLMAN e ROEHM, 2005), podendo facilitar na forma de exposição na placa de ELISA e o reconhecimento por anticorpos específicos.

O conhecimento de epítomos de célula B em proteínas virais é essencial para o conhecimento da patogênese, resposta imunológica da infecção e para o desenvolvimento de vacinas efetivas, podendo também ser utilizados como antígenos para testes diagnósticos (LIU et al., 2004). Partindo deste princípio, criaram-se novas perspectivas para definição de sequências, diversas proteínas têm sido estudadas e possíveis epítomos de célula B identificados, não apenas para o dengue, mas para diversos vírus como: vírus da encefalite do vale Murray (*Murray Valley Encephalitis Virus*- MVEV), vírus da encefalite japonesa (*Japanese Encephalitis Virus*-JEV), Citomegalovírus Humano (*Human Cytomegalovirus*-HCMV), HIV e vírus da síndrome respiratória aguda grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome Virus*-SARS) (LIU et al., 2004; LIU et al., 2006).

As tecnologias disponíveis para produção de antígenos recombinantes e suas utilizações nas mais diversas áreas de aplicações, incluindo produção de antígenos com finalidade diagnóstica, como as utilizadas nesse trabalho, vêm sendo realizada em diversos

sistemas de expressão. Dentre estes, os mais difundidos e aplicados são *E. coli* (NUC e NUC, 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (MUMBERG et al., 1995), *Pichia pastoris* (BORNERT et al., 2012); células de *Drosophila melanogaster* S2 (BRILLET et al., 2010), baculovírus (CARMO et al., 2012; PALOMARES et al., 2012) e adenovírus (COTTINGHAM et al., 2012). O sistema procarioto oferece a vantagem de ser um sistema relativamente barato e bem padronizado, com oferta de vários kits comerciais disponíveis para expressão dos mais diversos tipos de proteínas.

As proteínas alvos no desenvolvimento de insumos diagnósticos, predominantemente são a do Envelope Viral (Env) e Não estrutural 1 (NS1) do DENV. Neste trabalho foram adicionados fragmentos da proteína Não Estrutural 3 (NS3) no peptídeo ENS1/3 por ser estudada recentemente como alvo para pesquisa de anticorpos anti - DENV com resultados similares ao encontrados em testes utilizando a proteína NS1 ou do Env, quando comparados com testes comercialmente disponíveis (LI et al., 2005; ALVAREZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Alguns outros trabalhos também utilizaram estes sistemas para produção de proteínas NS1 e Env recombinantes do DENV, como expressão em levedura, vírus de vacínia, baculovírus e células de insetos (WALLIS et al., 2004; ZHOU et al., 2006). Todos esses sistemas são complexos, a manipulação e otimização de protocolos para expressão são laboriosos e apresentam um custo final de produção relativamente alto. O sistema de expressão utilizando *E. coli* continua a dominar entre os sistemas de expressão bacterianos, sendo o sistema preferido para investigações laboratoriais e desenvolvimento inicial de atividades comerciais. É considerado um ponto de referência útil para a comparação entre diferentes plataformas de expressão, sendo um sistema de fácil manipulação, preço acessível e bom rendimento no emprego em escala comercial de seus produtos e está sendo cada vez mais

utilizado na produção de proteínas mais complexas, como as proteínas glicoproteicas humanas (HUANG et al., 2012).

Neste trabalho, a expressão em *E. coli* utilizando o sistema de expressão em pRSET A da Invitrogen - USA, apresentou um bom rendimento quantitativo, porém os peptídeos foram expressos na forma parcialmente solúveis ou insolúveis, sendo necessário o processo de desnaturação por gradiente de uréia e imizadol. O rendimento total após desnaturação e renovelamento foi de 0,9 mg e 1,3 mg para cada 100 mL de caldo de cultura induzido dos genes *E/ENS3* e *ENS1/3* respectivamente. Verificou-se que esses peptídeos (*E/ENS3* e *ENS1/3*) são insolúveis ou parcialmente solúveis devido formarem corpos de inclusão no citoplasma da bactéria, o que poderia ser um ponto negativo caso se tratasse de um trabalho com uma proteína total, pois nem sempre é possível fazer o renovelamento, principalmente quando se pretende fazer estudos estruturais ou de função catalítica, que não foi o caso. Por outro lado esse fenômeno tem pontos positivos por ser um produto menos tóxico para a célula hospedeira, está em maior parte protegida da digestão proteolítica e até pode facilitar a purificação, já que os corpos de inclusão são facilmente isolados por centrifugação e geralmente consistem em agregados parcialmente puros de proteína superexpressa (SAMBROOK e RUSSEL 2001).

Frequentemente proteínas heterólogas expressas em *E. coli* acumulam-se como corpúsculo de inclusão (WANG et al., 2003). Existem quatro hipóteses que sugerem as formações desses corpúsculos: (1) quantidade limitada de chaperoninas frente à superexpressão gênica aliada a taxa de síntese protéica que excede a capacidade da célula de enovelar a proteína recém-sintetizada (KIEFHABER et al., 1991); (2) a diferença do estado redox entre *E. coli* e outras células eucariotas (YASUKAWA et al., 1995); (3) a presença de uma sequência particular de aminoácidos e (4) o fato do enovelamento de proteínas em

procariotos ocorrer simultaneamente com a tradução e no eucarioto esse processo ocorrer pós tradução (NETZER e HARTL 1997; WANG et al., 2003).

A precocidade que um teste seja capaz de detectar um antígeno ou anticorpo é essencial para seu emprego no diagnóstico de uma infecção, no caso da dengue a proteína NS1 é largamente reconhecida na literatura como uma proteína ideal para diagnóstico precoce da doença (BESSOFF et al., 2008; BESSOFF et al., 2010; SHU et al., 2004), sendo valorizada pela necessidade de um diagnóstico cada vez mais precoce e facilmente aplicável na rede pública de saúde (LIMA et al, 2011). Devido a esta característica que a proteína NS1 foi selecionada para compor um peptídeo (ENS1/3), pois já é caracterizada como uma proteína precocemente secretada no soro e ser um marcador importante da infecção viral.

Inicialmente foram testados os peptídeos separados, em diferentes placas de ELISA. Primeiro apenas o peptídeo denominado de E/ENS3 e depois o ENS1/3. Posteriormente foram utilizados os dois peptídeos no mesmo ELISA, obtendo resultados com maiores taxas de acertos, quando comparados com os resultados utilizando os peptídeos separadamente. Isso provavelmente deva ser explicado por possuírem epítomos distintos que são reconhecidos por anticorpos IgG e IgM nos dois peptídeos, como mostrado respectivamente na tabela 06 e 07.

Na padronização da quantidade de antígenos de cada peptídeo E/ENS3 e ENS1/3, foi utilizado inicialmente 2,0µg de cada peptídeo diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M e pH 9,6, sendo adicionados em cada poço um volume final de 100 µL. No primeiro momento, mesmo bloqueado com 5% de leite desnatado, houve muita ligação inespecífica, caracterizada pelo aparecimento de coloração branca nos poços caracterizados no final da reação. Diante desta situação, a concentração foi reduzida para 1,0µg de cada peptídeo, ou seja, reduzida pela metade. Foi verificado que os poços identificados como brancos estavam realmente sem reatividade no final da reação, mostrando que não havia ligação inespecífica de anticorpos primários e secundários. Nestas condições testamos todos os soros controle

disponibilizados, de acordo com o item 4.5 dos resultados. Simultaneamente foram feitas várias diluições dos soros controles positivos e negativos: 1/50, 1/100 e 1/200. Os conjugados anti-IgG e anti-IgM humanos também foram diluídos em 1/1000, 1/2000 e 1/5000. Os melhores resultados foram na diluição do soro de 1/100 e anticorpos secundários 1/2000.

Os cálculos de *Cut-off* para IgG e IgM foram utilizados 21 e 24 soros negativos da soroteca controle, respectivamente, em que foram calculados as medias e acrescentados mais 3 vezes o desvio padrão, obtendo o valor de 0,508 e 0,290 respectivamente para IgG e IgM, de acordo com o item 4.5 dos resultados. Os cálculos foram realizados no Microsoft Excel (Oficce - 2007).

As 363 amostras testadas para IgG, utilizando os antígenos expressos, resultaram em 233 positivas e 130 negativas, sendo 80 falsos negativos (34,33%) e 11 falsos positivos (8,46%). Quanto as 357 amostras testadas para IgM, resultaram em 235 positivas e 122 negativas, sendo 57 falsos negativos (24,25%) e 10 falsos positivos (8,19%). No caso da pesquisa de anticorpos IgG, a sensibilidade foi calculada em 65,7%, especificidade de 91,5%, valor preditivo positivo de 93,3% e valor preditivo negativo de 29,8%, índice kappa (grau de concordância corrigida) 0,51 (Tabela 08). Já para anticorpos IgM foram calculadas a sensibilidade em 75,75%, especificidade de 91,8%, valor preditivo positivo 94,7% e valor preditivo negativo 66,3% e índice kappa (grau de concordância corrigido) de 0,62 (Tabela 09). A quantificação da taxa de concordância entre os resultados de um, dois ou mais testes diagnósticos, índice Kappa ou Cohen, permitem estimar a reprodutibilidade. O grau de acordo entre diversas observações é quantificado pela frequência de dois resultados iguais. Neste caso, aplica-se ao resultado da análise de uma mesma amostra por dois testes: estes resultados concordam quando estão classificados na mesma categoria de variação (positivos definitivos, negativos definitivos e refinando a classificação dos incertos segundo sua distância relativa ao

nível crítico em: positivos prováveis ou possíveis e negativos prováveis ou possíveis) (PORTER et al., 1999).

No caso dos resultados encontrados, há descrição na literatura que em casos de infecção primária, é esperada a elevação dos níveis de IgM aos 3-5 dias e, na infecção secundária, os níveis detectáveis de IgM podem ser baixos (MEDIVAX, 2008). Algumas pessoas demoram a produzir os anticorpos, por fatores genéticos e ambientais, como a desnutrição, comprometendo a eficiência do exame e um bom prognóstico (GUPTA et al., 2010). A sensibilidade sorológica primária varia entre 85,4% a 98,9% e a sensibilidade sorológica secundária varia entre 46,6% a 64,7%. Já a especificidade sorológica varia entre 93,7% e 99,6% e, nos casos de negativo, a especificidade encontra-se entre 95,7% a 100%. Pode possuir reação cruzada rara com malária, fator reumatoide e vírus do Nilo ocidental (MEDIVAX, 2008).

A detecção de IgG indireto destina-se à detecção qualitativa de anticorpos dos sorotipos DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 e para a distinção entre a dengue primária e secundária, e sofre os mesmos processos metodológicos da detecção de IgM. Os altos níveis de IgG são características da infecção secundária, tendo pico de detecção do 6º ao 15º dia. É necessário teste específico para a detecção de tais níveis de IgG, pois outros testes não conseguem detectar. Esse método apresenta sensibilidade sorológica no segundo contato de 92,5% a 99,7% e especificidade de 96,6% a 100%. Pode ocorrer rara reação cruzada com vírus West Nilo (MEDIVAX, 2009).

A detecção de IgM e IgG em membrana permite avaliação quantitativa de anticorpos IgM e IgG anti-dengue no sangue total, plasma e soro humano. O teste tem boa aceitabilidade na diferenciação da infecção primária da secundária, sendo sua utilização recomendada em suspeita de infecção pelos achados clínicos. No caso de uma segunda (ou terceira) infecção sucessiva, o diagnóstico sorológico não é tão simples. Há uma resposta anamnética de

anticorpos, com aumento precoce e bastante acentuado de anticorpos da classe IgG, resultado que é altamente sugestivo de reinfecção por outro sorotipo do vírus dengue. Assim, nos primeiros dias da doença, pode haver um resultado reagente para anticorpos da classe IgG e não-reagente ou reagente em baixos títulos para a classe IgM, numa aparente contradição ao citado acima (SHU e HUANG 2004; GUIMARÃES et al., 2006).

A sensibilidade depende da severidade da doença na população estudada. A maioria dos testes diagnósticos é mais sensível nos casos mais sérios da doença. Por outro lado, a especificidade depende da prevalência de comorbidade com sintomas similares, fatores de convulsão (DA FONSECA e FONSECA 2002). A possibilidade da presença destas tendências deve ser considerada quando se analisa o resultado de estudos de testes diagnósticos. Idealmente, os casos e os controles devem ser selecionados de maneira a refletir a mesma prevalência da doença, com o mesmo grau de severidade e comorbidades, e com sintomas de confusão presentes na população na qual o teste será rotineiramente utilizado na prática (CHAKRAVARTI et al., 2000).

A interpretação de qualquer teste diagnóstico necessita do estabelecimento de uma regra de decisão. Esta regra pode ser qualitativa, subjetiva, ou quantitativa. A regra quantitativa determina valores numéricos mensuráveis, nível crítico (cut off) e “valores normais”. Qualquer que seja a regra, esta deve ser ajustável para refletir os números dos casos que serão identificados “anormais”. Selecionar a regra de nível crítico para um teste tem efeitos importantes na sensibilidade, especificidade, valor clínico e impacto econômico do teste (KITIGUL e SUANKEOW 2002). A regra de nível crítico de um teste pode variar dependendo das circunstâncias nas quais este teste está sendo utilizado. Nos casos de rastreamento, “*screening*”, é desejável que o teste possua elevada sensibilidade, pois as consequências da “falsa segurança” e descrédito do sistema diagnóstico podem ser desastrosas. A alta sensibilidade aumenta, no entanto, a proporção de resultados positivos

incluindo Falsos Positivos no screening inicial. Nestes casos, então, todos os testes positivos deverão ser confirmados por um segundo teste. Nestes testes de confirmação, a especificidade passa a ser muito importante, descartando os pacientes que não possuam a condição. Cada teste possui seus próprios valores de controle positivos e negativos que são utilizados para cálculo dos níveis críticos acima dos quais a leitura indica resultados positivos, abaixo dos quais a leitura indica resultados negativos ou entre os quais a leitura indica resultados incertos ou “*borderline*” (KITIGUL e SUANKEOW, 2002).

As dificuldades encontradas para produção de “*kits*” para diagnóstico consistem na produção em grande escala de antígenos a serem usados diretamente ou na captura do anticorpo presente no soro do paciente infectado.

Os antígenos normalmente utilizados são partículas virais inativadas provenientes de cultura celular ou extratos brutos, como macerado de cérebro de camundongos infectados com o vírus, o que esbarra em limitações, tais como: variação existente entre lotes, crescente problema de bioética relacionado ao uso de animais de laboratório e risco da manipulação de material patogênico (DE PAULA e FONSECA 2004).

O desenvolvimento continuado de testes baratos, sensíveis, específicos e de fácil execução, que sejam capazes de proporcionar diagnóstico precoce da infecção pelo vírus da dengue, é ainda uma necessidade. Vários aspectos precisam de atenção como: (1) desenvolvimento de testes capazes de diferenciar a infecção pelo DENV da infecção por outros vírus, mais especificamente, de diferenciar entre os sorotipos do DENV, (2) protocolos fáceis e baratos para a caracterização genômica e de carga viral, (3) uso de antígenos recombinantes como componentes de testes diagnósticos e (4) ferramentas laboratoriais que possam sugerir um prognóstico. Ainda, necessidade de infra-estrutura de laboratórios, treinamento de pessoal técnico e capacidade de pesquisa são limitados no Brasil. Esses fatores influenciam a deficiência da vigilância epidemiológica, o acompanhamento clínico dos casos

e o desenvolvimento de novas abordagens ao controle químico da dengue (OLIVEIRA et al., 2011).

Os esforços atuais para conter a dengue estão aquém, apesar dos avanços biotecnológicos e de programas de controle surgidos na última década. O possível sorotipo DENV 5 (NORMILE, 2013), apesar de estar associado a apenas um surto em humanos e suspeitar-se estar circulando em macacos pode, em outro momento, se espalhar em humanos, fazendo o controle do DENV e o desenvolvimento de vacinas um processo ainda mais desafiador.

VI- CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1- As ferramentas de bioinformática possibilitaram o alinhamento e mapeamento dos dois peptídeos denominados de E/ENS3 e ENS1/3, potencialmente antigênico, das proteínas do Envelope (E) e Não Estrutural (NS1 e NS3) do DENV demonstrado pelos ensaios enzimáticos realizados com os soros controles;

2- Os peptídeos expressos utilizados como antígenos em ensaio imunoenzimáticos mostraram baixa sensibilidade e alta especificidade;

3- A produção de antígenos de forma recombinante é uma alternativa relativamente barata para produção de grandes quantidades de proteínas sem a necessidade da utilização de animais de laboratório, relacionados às questões éticas;

4- A utilização desses antígenos pode vir a ser uma alternativa viável e de baixo custo para produção de insumos para o diagnóstico da dengue;

5- Ainda há a limitação de uma soroteca com uma quantidade de soros significativamente maiores para testes em maiores escalas, a fim de ter números de dados e interpretação dos resultados;

6- Os peptídeos E/ENS3 e ENS1/3 deste trabalho podem ser modificados, adicionando novas regiões das respectivas proteínas, e testados com soros mais bem caracterizados para obtenção de melhor especificidade e sensibilidade;

7- Os resultados encontrados demonstram que antígenos recombinantes são alternativas viáveis para produção de insumos para testes sorológico da dengue que poderão ser utilizados em larga escala no sistema Único de Saúde – SUS.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 2, p. 474-484, 2008.

ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.

ALEXANDER, N. et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. **Tropical Medicine & International Health**, v. 16, n. 8, p. 936-948, 2011.

ALLISON, S. L. et al. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4268-4275, 2001.

ALVAREZ, D. E. et al. Role of RNA structures present at the 3' UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. **Virology**, v. 339, n. 2, p. 200-212, 2005.

ÁLVAREZ, M. et al. Secuenciación directa a partir de un producto de PCR de una muestra de suero de la epidemia de FHD de 1981. **Rev Cubana Med Trop**, v. 48, p. 53-5, 1996.

ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, L. M. et al. Expression, Purification, and Evaluation of Diagnostic Potential and Immunogenicity of a Recombinant NS3 Protein from All Serotypes of Dengue Virus. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.

ANDERSON, R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 229-274, 2003.

ASSENBERG, R. et al. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. **Journal of Virology**, v. 83, n. 24, p. 12895-12906, 2009.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BESSOFF, K. et al. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 10, p. 1513-1518, 2008.

BESSOFF, K. et al. Utility of a commercial nonstructural protein 1 antigen capture kit as a dengue virus diagnostic tool. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 6, p. 949-953, 2010.

BORNERT, O. et al. Overexpression of membrane proteins using *Pichia pastoris*. **Current Protocols in Protein Science**, p. 29.2. 1-29.2. 24, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde. Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde. Brasília: MS, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Dengue : diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue. Situação Epidemiológica. 2013b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1525>. Acesso em: 04/05/2013.

BRILLET, K.; PEREIRA, C. A.; WAGNER, R. Expression of membrane proteins in *Drosophila Melanogaster* S2 cells: Production and analysis of a EGFP-fused G protein-coupled receptor as a model. **Methods in molecular biology (Clifton, NJ)**, v. 601, p. 119, 2010.

CASALI, C. G. et al. A epidemia de dengue/dengue hemorrágico no município do Rio de Janeiro, 2001/2002. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, n. 4, p. 296-9, 2004.

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

CHAMBERS, T. J. et al. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 22, p. 8898-8902, 1990b.

CHAKRAVARTI, D. N. et al. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. **Vaccine**, v. 19, n. 6, p. 601-612, 2000.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, v. 3, n. 8, p. 866-871, 1997.

CHEN, Y. C.; WANG, S. Y.; KING, C. C. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 2650-2657, 1999.

CHIU, W. W.; KINNEY, R. M.; DREHER, T. W. Control of translation by the 5'-and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8303-8315, 2005.

CHU, M. C.; O'ROURKE, E. J.; TRENT, D. W. Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 7, p. 1701-1712, 1989.

CLEAVES, G. R.; RYAN, T. E.; WALTER SCHLESINGER, R. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. **Virology**, v. 111, n. 1, p. 73-83, 1981.

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

COTTINGHAM, M. G. et al. Preventing spontaneous genetic rearrangements in the transgene cassettes of adenovirus vectors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 3, p. 719-728, 2012.

DA FONSECA, B. A. L.; FONSECA, S. N. S. Dengue virus infections. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 14, n. 1, p. 67-71, 2002.

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

DAS, D.; MONGKOLAUNGKON, S.; SURESH, M. R. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 66, n. 1, p. 66-72, 2009.

DE FIGUEIREDO, R. M. P. et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 667, 2008.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 745-748, 2010.

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

DEUBEL, V. et al. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. **Journal of virological methods**, v. 30, n. 1, p. 41-54, 1990.

DURHAM, David P. et al. Dengue dynamics and vaccine cost-effectiveness in Brazil. **Vaccine**, 2013.

EGLOFF, M. P. et al. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 11, p. 2757-2768, 2002.

ELSHUBER, S. et al. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 1, p. 183-191, 2003.

EMINI, E. A. et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, v. 55, n. 3, p. 836-839, 1985.

ESPADA-MURAO, L. A.; MORITA, K. Dengue and soluble mediators of the innate immune system. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 53, 2011.

FALGOUT, B.; CHANOCK, R.; LAI, C. J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. **Journal of Virology**, v. 63, n. 5, p. 1852-1860, 1989.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of Virology**, v. 65, n. 5, p. 2467-2475, 1991.

FALGOUT, B.; MARKOFF, L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. **Journal of Virology**, v. 69, n. 11, p. 7232-7243, 1995.

FEIGHNY, R. et al. Purification of native dengue-2 viral proteins and the ability of purified proteins to protect mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, n. 4, p. 405-412, 1992.

FIGUEIREDO, L. T. M.; SIMÕES, M. C.; CAVALCANTE, S. M. B. Enzyme immunoassay for the detection of dengue IgG and IgM antibodies using infected mosquito cells as antigen. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 702-707, 1989.

GEBHARD, L. G.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1739-1756, 2011.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 6 Suppl, p. 50-60, 1993.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55, 1995.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Community involvement in the control of *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, v. 61, n. 2, p. 169-179, 1996.

GUBLER, D. J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 158-165, 1984.

GUIMARÃES, M. H. et al. Inquérito soropidemiológico de dengue em dois municípios do Estado do Acre, fronteira Brasil-Bolívia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 1, 2006.

GUIRAKHOO, F.; BOLIN, R. A.; ROEHRIG, J. T. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 921-931, 1992.

GUPTA, P. et al. Assessment of World Health Organization definition of dengue hemorrhagic fever in North India. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 03, p. 150-155, 2010.

GUY, B. et al. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7229-7241, 2011.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 6, p. 621, 1996.

GUZMÁN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. S7-S16, 2010.

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

GUZMÁN, M. G. et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e811, 2010.

HAHN, C. S. et al. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 198, n. 1, p. 33-41, 1987.

HALSTEAD, S. B. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Review of Infectious Diseases**, v. 11, n. Supplement 4, p. S830-S839, 1989.

HALSTEAD, S. B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ?. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 20, n. 6, p. 407-415, 2006.

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

HARRIS, E. et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2634-2639, 1998.

HENCHAL, E. A. et al. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 1, p. 164-169, 1983.

HENCHAL, E. A. et al. Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 1, p. 162-169, 1985.

HILGARD, P.; STOCKERT, R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. **Hepatology**, v. 32, n. 5, p. 1069-1077, 2000.

HORSTICK, O. et al. Dengue vector-control services: how do they work? A systematic literature review and country case studies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 6, p. 379-386, 2010.

HONDA, E. R. et al. Design and heterologous expression of dengue virus envelope protein (E) peptides and their use for serological diagnosis. **Journal of Virological Methods**, 2012.

HUANG, C. J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 383-399, 2012.

HUANG, C. Y. H. et al. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. **Virology**, v. 396, n. 2, p. 305-315, 2010.

IMMUNE EPITOPE DATABASE (IEDB) in:
http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input

INNIS, B. L. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 4, p. 418-427, 1989.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **Journal of General Virology**, v. 40, n. 3, p. 531-544, 1978.

JAISWAL, S.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN, S. High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 33, n. 1, p. 80-91, 2004.

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

JINDADAMRONGWECH, S.; THEPPARIT, C.; SMITH, D. R. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. **Archives of Virology**, v. 149, n. 5, p. 915-927, 2004.

KAO, C. L. et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 38, n. 1, p. 5-16, 2005.

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Prediction of chain flexibility in proteins. **Naturwissenschaften**, v. 72, n. 4, p. 212-213, 1985.

KAUFMAN, B. M. et al. Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. Walter Reed Army Inst of Research Washington DC, 1989.

KIEFHABER, T. et al. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. **Nature Biotechnology**, v. 9, n. 9, p. 825-829, 1991.

KIMURA, R.; HOTTA, S. Studies on dengue: anti-dengue active immunization experiments in mice. **Jpn. J. Bacteriol**, v. 1, p. 96-99, 1944.

KITTIGUL, L.; SUANKEOW, K. Use of a rapid immunochromatographic test for early diagnosis of dengue virus infection. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 224-226, 2002.

KLIKS, S. C. et al. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 38, n. 2, p. 411-419, 1988.

KOOLMAN, J.; RÖEHM, K. H. **Color atlas of biochemistry**. New York: Thieme, 2005.

KRISHNAN, M. N. et al. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. **Journal of Virology**, v. 81, n. 9, p. 4881-4885, 2007.

KROEGER, A. et al. Dengue research and training supported through the World Health Organization. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 100, n. Supplement 1, p. 97-101, 2006.

KÜMMERER, B. M.; RICE, C. M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **Journal of virology**, v. 76, n. 10, p. 4773-4784, 2002.

KUNO, G.; GOMEZ, I.; GUBLER, D. J. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. **Journal of Virological Methods**, v. 33, n. 1, p. 101-113, 1991.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.

KURANE, I.; ENNIS, F. E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Seminars in Immunology**. 1992. p. 121-127.

LAI, C. Y. et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. **Journal of Virology**, v. 82, n. 13, p. 6631-6643, 2008.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 9, p. 2279-2284, 1997.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, n. 1, p. 2, 2006.

LEUNG, D. et al. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 45762-45771, 2001.

LEUNG, J. Y. et al. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **Journal of Virology**, v. 82, n. 10, p. 4731-4741, 2008.

LESCAR, J. et al. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. **Antiviral Research**, v. 80, n. 2, p. 94-101, 2008.

LI, J. et al. Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 31, p. 28766-28774, 2005.

LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165-1168, 2002.

LIMA, M. R. Q. et al. A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. e1147, 2011.

LIN, Y. L. et al. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. **Antiviral Research**, v. 56, n. 1, p. 93-96, 2002.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23-61, 2003.

LINDENBACH, B.; THIEL, H.; RICE, C. Flaviviridae: The Viruses and Theirs Replication. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P. **Fields Virology**. 5 ed., Washington: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, v. 2, 2007, p. 250-255.

LIU, I. J. et al. Disease-specific B cell epitopes for serum antibodies from patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) and serologic detection of SARS antibodies by epitope-based peptide antigens. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 4, p. 797-809, 2004.

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, 2008.

LORENZ, I. C. et al. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. **Journal of Virology**, v. 76, n. 11, p. 5480-5491, 2002.

LOZACH, P. Y. et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23698-23708, 2005.

LUCENA, L. T. de et al. Dengue na Amazônia: aspectos epidemiológicos no Estado de Rondônia, Brasil, de 1999 a 2010. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 3, p. 19-25, 2011.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, n. 1, p. 232-240, 1996.

MACKENZIE, J. M.; WESTAWAY, E. G. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. **Journal of virology**, v. 75, n. 22, p. 10787-10799, 2001.

MATUSAN, A. E. et al. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. **Journal of Virology**, v. 75, n. 20, p. 9633-9643, 2001.

MILLER, S. et al. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8873-8882, 2007.

MEDIVAX. Elisa de captura para IgM anti-dengue. **Instruções de uso**, Medivax, 2008. Disponível em: <http://www.medivax.com.br/uploads/Dengue_IgM_captura-Rev.11.2008.pdf> Acesso em: 17 nov. 2013.

MEDIVAX. Dengue IgG indireto - Elisa. **Instruções de uso**, Medivax, 2009. Disponível em: <http://www.medivax.com.br/uploads/Dengue_IgG_Indireto.pdf> Acesso em: 17 nov. 2013.

MODIS, Y. et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of virology**, v. 79, n. 2, p. 1223-1231, 2005.

MORIER DIAZ, L. et al. Preliminary study of AP-64 cell line *Aedes pseudoscutellaris* for dengue-1 and-2 virus multiplication. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 156, 1991.

MUÑOZ-JORDÁN, J. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington v. 100, p. 14333-14338, 2003.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L. et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8004-8013, 2005.

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

MUMBERG, D.; MÜLLER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v. 156, n. 1, p. 119-122, 1995.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. **Annual review of Immunology**, v. 29, p. 587-619, 2011.

MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 699-708, 2008.

MUYLAERT, I. R.; GALLER, R.; RICE, C. M. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 291-298, 1997.

NALL, T. A. et al. Enzymatic characterization and homology model of a catalytically active recombinant West Nile virus NS3 protease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p. 48535-48542, 2004.

NAVARRO-SANCHEZ, E. et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO Reports**, v. 4, n. 7, p. 723-728, 2003.

NETZER, W. J.; HARTL, F. U. Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 343-349, 1997.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R. M. R.; EPPINGHAUS, A. L. F. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 255-256, 2011.

NORMILE, D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415, 2013.

NUC, P.; NUC, K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Postepy Biochemistry**, v. 52, n. 4, p. 448-456, 2006.

OLIVEIRA, A. S. de et al. Diagnóstico laboratorial da dengue: situação atual e perspectivas; Dengue laboratory diagnosis: actual situation and perspectives. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 2, p. 125-130, 2011.

ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Dengue**: Guias de Atencion para Enfermos em la Region de las Americas. La Paz, Bolivia, 2010.

ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Dados da Dengue no Brasil 2013. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3159&Itemid=1>. Acesso em: 4 de Mai. 2013.

OSANAI, C. H. et al. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima Nota previa.; Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-4, 1983.

PARKER, J. M. R.; GUO, D.; HODGES, R. S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**, v. 25, n. 19, p. 5425-5432, 1986.

PENNA, M. L. A challenge for the public health system in Brazil: dengue control. **Cadernos de saude publica**, v. 19, n. 1, p. 305-309, 2002.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.

POERSCH, C. O. et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 4, p. 272-277, 2005.

PORTER, K. R. et al. Evaluation of a commercially available immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosing acute dengue infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 741-744, 1999.

RACE, M. W.; WILLIAMS, M. C.; AGOSTINI, C. F. M. Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito *Aedes pseudoscutellaris* cell line. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 18-22, 1979.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, n. 2, p. 479-493, 1990.

ROCCO, I. M.; KAVAKAMA, B. B.; SANTOS, C. L. S.. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 55-57, 2001.

ROCCO, I. M. et al. First isolation of dengue 4 in the state of São Paulo, Brazil, 2011. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 1, p. 49-51, 2012.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773-2786, 2010.

RONDÔNIA. Secretaria Estadual de Saúde de Rondônia. Agência Estadual de Vigilância em Saúde de Rondônia. Boletim Epidemiológico da Dengue – Semana de 01(30/12/2012) a 49(07/12/2013). 2103. Disponível em: <<http://www.agevisa.ro.gov.br/?p=3205>>. Acesso em: 12/01/2014.

ROSALES-LEON, L.; ORTEGA-LULE, G.; RUIZ-ORDAZ, B. Analysis of the domain interactions between the protease and helicase of NS3 in dengue and hepatitis C virus. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, n. 5, p. 585-594, 2007.

ROSEN, L. et al. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 3, n. 5, p. 878-882, 1954.

ROSS, Ted M. Dengue virus. **Clinics in laboratory medicine**, v. 30, n. 1, p. 149-160, 2010.

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, 1952.

SAN MARTÍN, J. L.; BRATHWAITE-DICK, O. La estrategia de gestión integrada para la prevención y el control del dengue en la región de las Américas. **Revista Panamericana Salud Publica**, v. 21, n. 1, p. 55-63, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning*. 3rd edition. 3 vol. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York. 2001.

SCHLESINGER, J. J.; BRANDRISS, M. W.; WALSH, E. E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. **The Journal of General Virology**, v. 68, p. 853-857, 1987.

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

SCOTT, R. M. et al. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, v. 141, n. 1, p. 1-6, 1980.

SENANAYAKE, S. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: a diagnostic challenge. **Australian Family Physician**, v. 35, n. 8, p. 609-612, 2006.

SHU, P. Y. et al. Development of group-and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2408-2416, 2003.

SHU, P. Y. et al. Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2489-2494, 2004.

SHU, P. Y.; HUANG, J. H. Current advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 4, p. 642-650, 2004.

SHU, P. Y. et al. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at airports. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 4, p. 589-591, 2009.

SINGH, K. R. P.; PAUL, S. Devi. Multiplication of arboviruses in cell lines from *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Current Science**, v. 37, p. 65-67, 1968.

SIERRA, B. C.; KOURI, G.; GUZMAN, M. G. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **Archives of Virology**, v. 152, n. 3, p. 533-542, 2007.

STADLER, K. et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of Virology**, v. 71, n. 11, p. 8475-8481, 1997.

SUZUKI, R. et al. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology**, v. 362, n. 2, p. 374-383, 2007.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue Urbanization and dengue ecology. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. Sup, p. 99-102, 2001.

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

TAVARES, W.; MARINHO, L. A. C. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias; Routines of diagnosis and treatment of the infectious and parasitic diseases. Atheneu, 2005.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences?. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, 2005.

TELES, F. R. R.; PRAZERES, D. M. F.; LIMA-FILHO, J. L. Trends in dengue diagnosis. **Reviews in medical virology**, v. 15, n. 5, p. 287-302, 2005.

TEMPORÃO, J. G. et al. Dengue virus serotype 4, Roraima state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 938, 2011.

THE RETROSCOPE. Information about infectious diseases, medical research and related stuff. Dengue. Disponível em: <<http://www.retroscope.eu/wordpress/dengue-virus/>>. Acesso em: 02 de jun. 2012.

THEPPARIT, C.; SMITH, D. R. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. **Journal of Virology**, v. 78, n. 22, p. 12647-12656, 2004.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. Surto de dengue em Boa Vista, território de Roraima, Brasil. **Bol Epidemiol**, v. 14, n. 9, p. 93-101, 1982.

VÁZQUEZ, S. et al. Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. **Vaccine**, v. 20, n. 13, p. 1823-1830, 2002.

VILLORDO, S. M.; GAMARNIK, A. V. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. **Virus Research**, v. 139, n. 2, p. 230-239, 2009.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. Dengue and dengue hemorrhagic fever. CAB International, New York, NY, p. 313-333, 1997.

- WAHALA, W. M. P. B. et al. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, v. 392, n. 1, p. 103-113, 2009.
- WALLIS, T. P. et al. Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20729-20741, 2004.
- WANG, A. et al. A novel method for increasing the expression level of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 30, n. 1, p. 124-133, 2003.
- WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of Virology**, v. 74, n. 7, p. 3227-3234, 2000.
- WARRENER, P.; TAMURA, J. K.; COLLETT, M. S. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. **Journal of Virology**, v. 67, n. 2, p. 989-996, 1993.
- WELSCH, S. et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. **Cell host & Microbe**, v. 5, n. 4, p. 365-375, 2009.
- WESTAWAY, E. G.; BLOK, J. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**, p. 147-173, 1997.
- WESTAWAY, E. G.; KHROMYKH, A. A.; MACKENZIE, J. M. Nascent Flavivirus RNA Colocalized *in Situ* with Double-Stranded RNA in Stable Replication Complexes. **Virology**, v. 258, n. 1, p. 108-117, 1999.
- WESTAWAY, E. G.; MACKENZIE, J. M.; KHROMYKH, A. A. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 99-140, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2 ed. Geneva, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue: guidelines for the diagnosis, treatment, prevention and control. 9. ed. Geneva, 2009.
- WU, S. J. L. et al Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v. 6, p. 816-820, 2000.
- YASUKAWA, T. et al. Increase of solubility of foreign proteins in Escherichia coli by coproduction of the bacterial thioredoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 43, p. 25328-25331, 1995.
- YU, I.M. et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1834-1837, 2008.
- ZELLWEGER, R. M.; PRESTWOOD, T. R.; SHRESTA, S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. **Cell Host & Microbe**, v. 7, n. 2, p. 128-139, 2010.

ZHOU, J. et al. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia. Pastoris*. **Virus Genes**, v. 33, n. 1, p. 27-32, 2006.