UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
CENTRO DE PESQUISA EM VIROLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

**PADRONIZAÇÃO DE UMA NOVA TÉCNICA PARA DETECÇÃO DE
ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ANTI-DENGUE BASEADA NA
RT-PCR EM TEMPO REAL**

Ana Luísa Pereira Feitosa

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Ribeirão Preto
2015

ANA LUISA PEREIRA FEITOSA

**Padronização de uma nova técnica para detecção de anticorpos
neutralizantes anti-dengue baseada na RT-PCR em tempo real**

Dissertação de mestrado apresentada ao curso
de Pós-Graduação em Clínica Médica –
Investigação Biomédica da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de
São Paulo, para a obtenção do título de Mestre
em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Ribeirão Preto, SP
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Feitosa, Ana Luisa Pereira

Padronização de uma nova técnica para detecção de anticorpos neutralizantes anti-dengue baseada na RT-PCR em tempo real/ Ana Luisa Pereira Feitosa; orientador: Benedito Antônio Lopes da Fonseca- Ribeirão Preto, 2015.
77p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós Graduação em Clínica Médica – Investigação Biomédica

1. Dengue 2. Anticorpos Neutralizantes. 3. RT-PCR em tempo real 4. Ensaio de neutralização viral

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ana Luísa Pereira Feitosa

Título: Padronização de uma nova técnica para detecção de anticorpos neutralizantes anti-dengue baseada na RT-PCR em tempo real

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica – Investigação Biomédica.

Apresentada em: 06/11/2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Roberto Martinez
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. José Luiz Proença Módena
Universidade Estadual de Campinas

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Telma e Eurico e ao meu irmão Luís Guilherme, que sempre acreditaram em mim e fizeram todos os meus sonhos possíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca pela oportunidade e por ter me aceito como sua aluna em seu laboratório. Pela dedicação e ensinamentos que foram essenciais na confecção deste trabalho.

A todos os funcionários e docentes do Departamento de Clínica Médica e de outros departamentos nos quais cursei minhas disciplinas, obrigada pelo conhecimento transmitido.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana por ter gentilmente disponibilizado amostras para este estudo.

A todos os amigos e colegas do Centro de Pesquisa em Virologia, obrigada pelos bons momentos que passamos juntos, pelos cafés, conversas, risadas. Guardo com carinho todos vocês.

A Adriana e ao Emerson da pós graduação por toda a atenção durante esse período, sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos do laboratório: Flávia, Flávio, Beatriz, Taline, por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos, Danillo, que me acompanhou desde a vinda ao laboratório em 2011 e fez parte do meu amadurecimento científico, Emiliana e Fernanda, que foram importantes na confecção desse trabalho.

Aos que não estão mais presentes no laboratório, Luiza Castro por ter me acompanhado nos processos iniciais do projeto e ter deixado muitos ensinamentos. A Dona Leila, pelas pimentinhas caseiras e os bons momentos na hora do almoço.

Aos meu pais Eurico e Telma e meu irmão Luís Guilherme por todo o amor, carinho e dedicação em toda essa caminhada. São imensamente responsáveis por tudo que consegui e ainda conseguirei. Minha eterna gratidão.

Ao meu namorado Fábio por toda paciência, carinho, respeito e ajuda nesse trabalho. Muito obrigada!

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa e financiamento desse estudo.

“Isso de ser exatamente o que se é ainda vai nos levar além.”

Paulo Leminski

FEITOSA, A.L.P. **Padronização de uma nova técnica para detecção de anticorpos neutralizantes anti-dengue baseada na RT-PCR em tempo real.** 2015-77f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

RESUMO

Por representar a mais importante arbovirose em nível mundial, as infecções causadas pelos vírus da dengue são de grande importância em nosso país, apresentando uma ampla variedade de sintomas clínicos que vão desde infecção assintomática até formas mais graves da doença. O título de anticorpos neutralizantes produzidos frente à infecção por dengue parece ser determinante na forma de apresentação da doença no paciente. Atualmente, a forma com que o teste de neutralização é realizado demanda tempo para sua realização. O objetivo deste trabalho foi padronizar um ensaio de neutralização viral por RT-PCR em tempo real em cepas virais dos quatro sorotipos dengue para, posteriormente, ser empregada na detecção rápida e em grande escala de anticorpos em soro de pacientes e de candidatos vacinais. Para isso, foram construídas curvas padrão, para cada sorotipo viral, por meio da transcrição *in vitro* do RNA viral. O ensaio de neutralização padronizado nesse estudo reduziu o número de dias de detecção da neutralização em 48 horas quando comparada com a técnica de neutralização tradicional (PRNT), além de utilizar técnicas moleculares sensíveis e específicas para detecção como a RT-PCR em tempo real que garantem maior aplicabilidade do teste.

Palavras Chaves: Dengue, Anticorpos neutralizantes, RT-PCR em tempo real, Ensaio de neutralização viral, PRNT.

FEITOSA, A.L.P. **Standardization of a new technique for anti-dengue neutralizing antibodies detection based on Real Time RT-PCR.** 2015-77f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ABSTRACT

Because Dengue virus is the most important arboviral disease worldwide, infections caused by this pathogen are of great importance in Brazil, producing a wide variety of clinical symptoms ranging from asymptomatic infection to more serious forms of the disease. The title of neutralizing antibodies produced against the dengue infection appears to be determinant in the outcome of the disease. Currently, neutralization tests that have been performed take time for its execution. The aim of this study was to standardize a viral neutralization assay by real-time RT-PCR of viral strains of the four Dengue serotypes to subsequently be used for rapid detection and large-scale using antibodies of patients and for vaccine candidates. For this matter, standard curves were constructed for each Dengue serotype, by in vitro transcription of viral RNA. The neutralization assay in this study reduced the period of neutralization to 48 hours, compared to traditional neutralization test (PRNT), and it uses a more sensitive and specific molecular technique for detection of neutralizing antibodies, such as real time RT-PCR, to ensure greater applicability of the test.

Keywords: Dengue virus, Neutralizing Antibodies, Real time RT-PCR, Neutralization Assay, PRNT

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da partícula viral: A. Estrutura da distribuição das proteínas do envelope na partícula imatura do DENV. B. Organização das proteínas nos vírus imaturos e maduros. C. Estrutura da distribuição das proteínas do envelope na partícula madura do DENV Fonte: Heinz and Allison 2001; Kuhn <i>et al.</i> 2002; Heinz and Stiasny, 2011.....	3
Figura 2. Representação esquemática do genoma dos vírus dengue. Estão delineadas as regiões 5' e 3' UTR's e a região de leitura aberta (ORF) indicando a clivagem da poliproteína em 10 proteínas, sendo 3 estruturais (C, M, E) e 7 não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) Fonte: Iglesias and Gamarnik 2011.....	3
Figura 3. Replicação e maturação dos flavivírus: Desde a entrada até a maturação e liberação viral nas células. Fonte: Pierson and Diamond, 2012.....	6
Figura 4. Mapa da dengue em 2013: Representação dos níveis de casos de dengue no mundo em 2013 (marcados em vermelho) e as áreas de risco para a doença. Fonte: Health Map, CDC, 2013.....	7
Figura 5. Classificação dos casos de dengue e níveis de gravidade de acordo com DENCO (adaptado WHO, 2009).	12
Figura 6. ADE: Anticorpos produzidos em uma infecção anterior ao se ligarem ao vírus de uma infecção atual, seriam sub-neutralizantes, facilitando a entrada dos vírus nas células e o possível aumento de carga viral, evoluindo para maior gravidade da doença. Fonte: Whitehead <i>et al.</i> 2007.....	14
Figura 7. Clonagem gênica: Vetor de clonagem utilizado na reação com tamanho de 2886pb.	24
Figura 8. Clonagem gênica em modelo esquemático.	24
Figura 9. Perfil de replicação viral em modelo esquemático.	28
Figura 10. Ensaio de neutralização viral em modelo esquemático.	29
Figura 11. Ensaio neutralização de reação-cruzada em modelo esquemático.....	30
Figura 12. Caracterização molecular dos vírus: Gel de agarose a 2%, 80V/1hora. M: marcador molecular 100pb (Fermentas), C: controle negativo, D1: DENV-1 (482pb), D2: DENV-2 (119pb), D3: DENV-3 (290pb), D4: DENV-4 (389pb).	31
Figura 13. Ensaio de placa para titulação dos vírus dengue. As diluições decimais da semente viral, em duplicata, permitiram contar os plaques e determinar o título de $1,5 \times 10^5$ PFU/mL para o DENV-3.....	32
Figura 14. Produto da linearização dos plasmídeos: <i>SacI</i> (A) e <i>EcoRI</i> (B) em gel de agarose 0,8%. M: marcador de peso molecular 1Kb Fermentas, PD1: clone de DENV-1, PD2: clone de DENV-2, PD3: clone de DENV-3, PD4: clone DENV-4, LD1: clone de DENV-1	

linearizado, LD2: clone de DENV-2 linearizado, LD3: clone de DENV-3 linearizado e LD4: clone DENV-4 linearizado..... 33

Figura 15. Análise das curvas padrão para DENV-1, DENV-2, DENV-3. E DENV-4 A. Curva de amplificação da reação de RT-PCR em tempo real para o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, utilizando diluições seriadas decimais do RNA transcrito. Valor de ΔR_n no eixo Y e ciclo da reação no eixo X. B, Curva padrão com o valor de Ct (Ciclo do limiar) no eixo Y e o número de cópias no eixo X. No lado inferior direito, estão expressos os valores de inclinação da reta, intersecção, correlação e eficiência da reação. 35

Figura 16. Perfil de replicação para os quatros sorotipos virais: Todas as cepas virais foram avaliadas frente à multiplicidade de infecção viral (MOI) em cinco dias de coletas. 36

Figura 17. Ensaio de neutralização viral para cada sorotipo: vírus submetidos ao seu anticorpo específico (MIAF) para obtenção de título de neutralização viral (IC_{50}). A) Neutralização DENV-1 B) Neutralização DENV-2 C) Neutralização DENV-3 D) Neutralização DENV-4. O título de anticorpos neutralizantes ficou entre o log 2 e 3, o que variou em um título de 1:100 a 1:400. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vírus utilizados.	20
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados nas amplificações para confirmação dos sorotipos de Dengue.....	21
Tabela 3. Relação de oligonucleotídeos utilizados nas amplificações para a clonagem de cada sorotipo e tamanho dos fragmentos gerados.....	23
Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos e sondas utilizados na construção de curvas-padrão.	26
Tabela 5. Titulação viral dos quatro sorotipos DENV.....	32
Tabela 6. Título de anticorpos neutralizantes incubados com os quatro sorotipos dengue. .	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	– Ácido acetilsalicílico
ADE	– Antibody Dependent Enhancement of infection
C	– Proteína do cápsideo
CMC	–Carboximetilcelulose
COMP-	Dengue com complicações
CPV	– Centro de Pesquisa em Virologia
Ct	– Cycle Threshold
DC	– Dengue Clássica
DENCO	– Controle da dengue
DENV-	Vírus Dengue
DNA	– Ácido Desoxirribonucléico
E	– Proteína do envelope
ELISA	– Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FHD	– Febre Hemorrágica da Dengue
RNA-	Ácido Ribonucléico
FMRP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
LB-	Meio Luria-Bertani
M-	Proteína de membrana
MA	– Estado do Maranhão
mAbs	– Anticorpos monoclonais (Monoclonal Antibodies)
MEM	– Meio mínimo essencial
MIAF	– Fluído ascético de camundongos imunizados (Mouse Immune Ascitic Fluid)
MOI	– Multiplicidade de Infecção (Multiplicity of Infection)
ORF	– Janela de leitura aberta (Open Reading Frame)
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PBS	– Tampão fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)
prM	– Proteína pré-membrana
PCR	– Reação em cadeia da Polimerase
PFU-	Plaque-forming unit
pH-	Potencial hidrogeniônico

RT-PCR – Reação em cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa
RT- Transcrição Reversa

RR – Estado de Roraima

SARA- Síndrome da Angústia Respiratória Aguda

SCD – Síndrome do Choque da Dengue

SP- Estado de São Paulo

SFB – Soro Fetal Bovino

SVS- Sistema de Vigilância Sanitária

USP – Universidade de São Paulo

UTR – Região não-traduzida (untranslated region)

WHO- World Health Organization

WNV- Vírus do Oeste do Nilo (West Nile Virus)

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais do vírus	2
1.2. Epidemiologia	7
1.3. Manifestações Clínicas	10
1.3.1. Dengue Clássica	10
1.3.2. Dengue hemorrágica	11
1.3.3. Manifestações clínicas incomuns	12
1.4. Imunopatogênese	13
1.4.1. Teoria do aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE)	13
1.4.2. Teoria da interação multifatorial	14
1.5. Diagnóstico, tratamento e prevenção	15
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Vírus	20
4.2. Estoques virais	20
4.2.1. Preparo dos estoques virais em cérebros de camundongos	20
4.2.2. Preparação dos estoques virais em células C6/36	20
4.3. Diagnóstico Molecular do Vírus	21
4.4. Titulação viral	22
4.5. Obtenção das curvas padrão	22
4.5.1. Produção de clones para DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4	22
4.5.2. Transcrição <i>in vitro</i>	25
4.5.3. RT-PCR em tempo real	25
4.6. Padronização do ensaio de neutralização por RT-PCR real	27

4.6.1.	Perfil de replicação viral	27
4.6.2.	Ensaio de neutralização viral para cada sorotipo.....	28
4.6.3.	Ensaio neutralização de reação-cruzada	29
5.	RESULTADOS	31
5.1.	Estoques virais e detecção molecular.....	31
5.2.	Titulação viral	31
5.3.	Obtenção de curvas padrão.....	32
5.4.	Padronização do ensaio de neutralização por RT-PCR em tempo real.....	35
5.4.1.	Perfil de replicação.....	35
5.4.2.	Ensaio de neutralização viral para cada sorotipo.....	36
5.4.3	Ensaio neutralização de reação-cruzada	38
6.	DISCUSSÃO	40
7.	CONCLUSÃO	47
8.	REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença febril aguda causada pelo vírus dengue (DENV), um arbovírus que apresenta quatro sorotipos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Os DENVs são transmitidos ao homem por meio da picada do mosquito *Aedes aegypti*, embora tenha sido relatada a transmissão por outras espécies do gênero em outras partes do mundo. A dengue é considerada a mais importante arbovirose do mundo, sendo notável sua ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais. Nas últimas décadas, a dengue se expandiu de forma acelerada tornando-se uma das doenças mais prevalentes transmitidas por vetores. Cerca de 3,6 bilhões de pessoas, o que corresponde a 55% da população mundial, correm o risco de serem infectadas pelos vírus dengue (Da Costa Faria *et al.* 2013). Uma publicação recente, usando métodos epidemiológicos avançados, mostrou que das 390 milhões de infecções por dengue que ocorrem anualmente, 96 milhões representam dengue clássica (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD), considerando que os outros 300 milhões apresentem infecções assintomáticas (Bhatt *et al.* 2013).

A dengue constitui um sério problema de saúde pública, especialmente nos países tropicais como o Brasil, implicando nas finanças e na infraestrutura dos sistemas de saúde, com um gasto anual de cerca de 1,5 bilhões de reais (Shepard *et al.* 2011). No Brasil, a dengue foi reintroduzida em 1986 e, desde então, espalhou-se por todo o território nacional, ocorrendo de forma endêmica em quase todos os estados.

A doença apresenta desde infecções assintomáticas até as formas graves que foram, por muito tempo, denominadas dengue com complicações, febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD). A partir de 2009, a OMS sugeriu uma nova classificação dos casos de dengue, dividindo em dengue com e sem sinais de alerta (dengue com complicações) e dengue grave. As formas graves da doença estão intimamente relacionadas à reinfeção, e por isso, é de grande importância clínica e epidemiológica conhecer os sorotipos circulantes e evitar a co-circulação de mais de um sorotipo do vírus, já que até o presente momento não há vacinas disponíveis. Apesar de tanto conhecimento sobre a dengue, ainda pouco se sabe como prevenir ou prever as formas graves da doença, além da falta de vacinas

eficazes contra os quatro sorotipos virais (vacina tetravalente). Este fato torna-se ainda mais evidente quando se discute quais são os títulos de anticorpos considerados protetores contra uma nova infecção pelo mesmo sorotipo. A seguir, serão apresentados alguns aspectos sobre os vírus que servirão de base para a compreensão dos temas abordados nesse estudo.

1.1. Aspectos gerais do vírus

Os DENVs pertencem à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* (Westaway *et al.* 1985), que apresenta cerca de 70 membros. Diferenças antigênicas observadas entre os DENVs, levaram à classificação destes em 4 sorotipos distintos, sendo eles denominados de vírus dengue tipo 1 (DENV-1), vírus dengue tipo 2 (DENV-2), vírus dengue tipo 3 (DENV-3) e vírus dengue tipo 4 (DENV-4) (Sabin 1952; Scherer 1968). Esses vírus levam a um quadro de manifestações clínicas semelhantes e a imunidade adquirida após infecção com cada um dos quatro sorotipos é duradoura e mediada principalmente por anticorpos neutralizantes. Apesar de haver reação sorológica cruzada entre estes vírus, resultando em proteção cruzada por alguns meses após infecção aguda por qualquer um dos sorotipos, a longo prazo os anticorpos gerados frente a um sorotipo não protegem o indivíduo contra infecções secundárias por outros sorotipos.

Anticorpos antivirais contribuem significativamente para a proteção contra a infecção por flavivírus (Roehrig *et al.* 2001) e têm-se revelado uma boa correlação de proteção para as vacinas de flavivírus já existentes (Heinz *et al.* 2007). A compreensão da estrutura e bases imunológicas para a proteção mediada por anticorpos contra a infecção por flavivírus tem evoluído rapidamente (Pierson *et al.* 2008). No entanto, evidências mais recentes sobre a composição e estrutura dos flavivírus podem identificar complexidades não observadas anteriormente e que podem ter impacto na eficácia de anticorpos neutralizantes ou no potencial para se agravar a doença (Dowd and Pierson 2011).

As partículas virais possuem simetria icosaédrica e são constituídas por um core de ribonucleotídeos circundado por uma bicamada lipídica, com aproximadamente 45-55nm de diâmetro (Murphy 1980). O envelope viral é composto por duas proteínas, proteína E e proteína M, sendo que o núcleo capsídeo consiste na proteína C associada ao RNA viral (Figura 1).

Figura 1. Representação da partícula viral: A. Estrutura da distribuição das proteínas do envelope na partícula imatura do DENV. B. Organização das proteínas nos vírus imaturos e maduros. C. Estrutura da distribuição das proteínas do envelope na partícula madura do DENV. Fonte: Heinz and Allison 2001; Kuhn *et al.* 2002; Heinz and Stiasny, 2011.

O genoma viral consiste de uma molécula de RNA de fita simples, polaridade positiva com aproximadamente 10,5 kilobases (Figura 2). Apresenta estrutura m^7GpppA na extremidade 5' para início da tradução e não apresenta cauda poli (A) na extremidade 3' (Brinton 1986; Brinton and Dispoto 1988, Wengler 1981). O vírus apresenta uma única região de leitura aberta (ORF) e, desta forma, a tradução do genoma resulta na síntese de uma única poliproteína precursora que é processada co-traducionalmente e pós-traducionalmente por proteases virais e celulares. São codificadas três proteínas estruturais (E, M (prM) e C) que constituem a partícula viral e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que são essenciais para a replicação do vírus (Chambers *et al.* 1990; Henschal and Putnak 1990).

Figura 2. Representação esquemática do genoma dos vírus dengue. Estão delineadas as regiões 5' e 3' UTR's e a região de leitura aberta (ORF) indicando a clivagem da poliproteína em 10 proteínas,

sendo 3 estruturais (C, M, E) e 7 não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5)
Fonte: Iglesias and Gamarnik 2011.

Dentre as proteínas estruturais, a do envelope (E) é uma proteína de 53kDa que organiza os processos de entrada do vírus na célula (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005). É composta por três domínios distintos (I, II e III) que podem variar entre uma cepa e outra. A proteína do envelope desempenha um papel dominante na produção de anticorpos neutralizantes e indução da resposta imune, além de apresentar o sítio de ligação ao receptor celular (Rey 2003; Rodhenius-Zybert, Wilschut and Smit 2011). Ela está presente na partícula viral madura como homodímero e, no ambiente ácido do endossomo tardio, sofre uma trimerização, resultando na fusão com a membrana do endossomo (Modis *et al.* 2003; Mukhopadyay *et al.* 2005). Os três domínios estruturais dessa proteína são reconhecidos de forma diferente pelos anticorpos anti-dengue (Roehrig *et al.* 1998; Sukupolvi-Petty *et al.* 2010). Considera-se que anticorpos contra o domínio III apresentam menor reação cruzada entre os sorotipos e neutralizem melhor o vírus (Lai *et al.* 2008; Wahala *et al.* 2009).

A proteína pré-membrana (prM) é uma glicoproteína que facilita o dobramento da proteína E e regula o seu estado oligomérico, evitando a fusão acidental durante a saída de partículas virais (Lorenz *et al.* 2002). A prM está presente em vírus imaturos e sua clivagem proteolítica por uma protease trans-golgi é crucial para a morfogênese viral e liberação de virions maduros (Junjhon *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2003; Zheng *et al.* 2010). Esse processo de “maturação” resulta na exposição do domínio de ligação do envelope viral ao receptor celular e consequente aumento da infectividade viral (Yu *et al.* 2008; Zybert *et al.* 2008). Contudo, células infectadas com os vírus dengue também podem liberar um alto número de partículas virais contendo a porção “pr”, e estes vírus “imaturos” podem tornar-se infecciosos por meio da ligação de anticorpos anti-prM, o que poderia levar a um aumento na gravidade da doença (Huang *et al.* 2006, Junjhon *et al.* 2010; Zybert, Wilschut and Smit 2008).

Dentre as proteínas não estruturais, a glicoproteína NS1 tem sido a mais estudada. Ela pode apresentar três formas diferentes: uma forma residente no retículo endoplasmático (RE), que se co-localiza com o complexo de replicação viral, uma forma ancorada na superfície celular, e uma forma secretada (sNS1) (Flamand

et al. 1999; Lindenbach and Rice 2003). Esta proteína parece participar da fase precoce de replicação viral (Bartenschlager and Miller 2008; Henschal and Putnak 1990). A forma secretada da NS1, assim como a glicoproteína E, são alvos dominantes da imunidade humoral e podem apresentar um papel significativo na patogênese da doença (Clyde *et al.* 2006), sendo capaz de induzir a formação de anticorpos fixadores de complemento (Avirutnan *et al.* 2011). Níveis elevados de NS1 circulante durante o início da infecção, apresentaram relação com o desenvolvimento da FHD (Libraty *et al.* 2002).

Durante a infecção, o ciclo de replicação do vírus inicia-se com a adsorção da partícula viral à célula alvo por meio da ligação da proteína E ao receptor celular. Interações entre a proteína E e a molécula de adesão intracelular específica de células dendríticas (DC-SIGN) são essenciais para a infecção dessas células e para uma internalização eficiente da partícula viral. Os flavivírus entram na célula por endocitose, por uma via dependente de clatrina, e se fundem com as membranas endossômicas por uma via dependente de pH. Os flavivírus se deslocam em sua forma imatura para as membranas do retículo endoplasmático rugoso, onde as proteínas prM e E irão interagir. A maquinaria de montagem do vírus continua localizando-se próximo ao sítio de replicação viral e as proteínas do capsídeo viral, juntamente com o RNA viral, também são encontradas na membrana do retículo endoplasmático. O processamento das partículas imaturas no complexo de Golgi é dependente de pH (ligeiramente ácido) para que ocorra o rearranjo da proteína E na partícula viral. A proteína prM permanece associada à partícula do vírus e em um pH ainda mais ácido, pode ser clivada por uma protease denominada Furina. A saída do vírus para um meio extracelular neutro resulta na dissociação da região "pr" da prM e, conseqüentemente, na formação de vírus maduros (Pierson and Diamond, 2012). Estudos recentes relatam que a clivagem parcial da prM desencadeia a formação de vírus parcialmente maduros e que estes podem ser infecciosos. A presença de prM não clivada nos flavivírus impacta diretamente na interação vírus-anticorpo bem como na produção de anticorpos neutralizantes (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). O esquema da replicação e maturação dos flavivírus está representado na Figura 3.

Figura 3. Replicação e maturação dos flavivírus: Desde a entrada até a maturação e liberação viral nas células. Fonte: Pierson and Diamond, 2012.

Ainda não está totalmente esclarecida qual é a principal célula infectada pelos DENVs. Alguns estudos propõem que a replicação primária ocorra em células que apresentem o receptor Fc da linhagem monocítica/macrofágica (Von Sydow *et al.* 2000; Wu *et al.* 2000). O primeiro alvo dos vírus seriam células dendríticas presentes na pele. Ao ser introduzido na pele do hospedeiro pela picada do mosquito, o vírus infectaria tanto células de Langherhans como células dermais e intersticiais. Estas células são mais permissivas à infecção, quando comparadas aos monócitos e macrófagos (Palucka 2000; Wu *et al.* 2000). Além das células dendríticas, o vírus da dengue parece infectar uma grande variedade de células, como hepatócitos, linfócitos B e T, células endoteliais e fibroblastos (Durbin *et al.* 2008; Kou *et al.* 2008). Condizente com estas observações, foram detectados antígenos virais em muitos tecidos, incluindo fígado, baço, linfonodos, timo, rins, pulmões, pele e, principalmente, células fagocíticas mononucleares (Jessie *et al.* 2004).

1.2. Epidemiologia

Nos últimos 30 anos, as infecções pelos DENVs tem alcançado proporções globais, com um aumento na frequência e intensidade de epidemias associadas a síndromes clínicas mais graves (Gubler 1998; Gubler 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2009, a ocorrência dos casos de dengue foi estimada em 50-100 milhões de casos em todo o mundo, e cerca de 2,5 bilhões de pessoas encontravam-se em risco eminente de serem infectadas (Guzman *et al.* 2010) (Figura 4). Dentro desta estimativa, cerca de 500.000 a 1.000.000 de casos evoluem para FHD, em sua maioria crianças. Dentre esses casos, 20.000 resultam em óbitos. Porém, em um estudo mais recente, estima-se que a ocorrência da doença seja de 390 milhões de casos ao ano em todo o mundo e que 96 milhões apresentem manifestação sintomática (Baht *et al.*, 2013).

Sem tratamento adequado, que consiste basicamente na reposição de fluidos e repouso, e sem diagnóstico precoce, o óbito em casos de dengue hemorrágica pode exceder até 20%. Entretanto, quando os pacientes são devidamente diagnosticados e tratados, este percentual pode ser reduzido a valores menores que 1% (Gibbons and Vaughn 2002; Mackenzie *et al.* 2004).

Figura 4. Mapa da dengue em 2013: Representação dos níveis de casos de dengue no mundo em 2013 (marcados em vermelho) e as áreas de risco para a doença. Fonte: Health Map, CDC, 2013.

A emergência global da dengue está diretamente ligada à carência de um programa eficiente de combate ao mosquito transmissor, acompanhada do grande crescimento populacional e da urbanização não planejada, que acabaram por criar condições que sustentam a transmissão de doenças causadas por arbovírus (Gubler 1998). Outros fatores também podem ter contribuído para esse fato, como o aumento do número de viagens aéreas, a migração e a deterioração dos programas de saúde nos países em desenvolvimento (Guzman and Kouri 2002).

A doença é transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo que nas Américas o *Aedes aegypti* é o único transmissor dos vírus dengue com importância epidemiológica. Outra espécie, o *Aedes albopictus*, foi introduzida nas Américas, todavia, por razões desconhecidas, sua importância epidemiológica como transmissor da dengue tem se restringido apenas ao continente asiático (Rodhain and Rosen 1997). A transmissão da doença envolve a ingestão de sangue virêmico por fêmeas do mosquito *Aedes aegypti*, seguida da passagem do vírus para um segundo hospedeiro susceptível, no caso o homem. É necessário, no entanto, um período de incubação no vetor de 8-10 dias (período de incubação extrínseco) para que ocorra a replicação e disseminação viral antes que o vírus possa ser encontrado na saliva dos mosquitos (Monath 1994). O homem é o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção (Gubler 2001).

No Brasil, a dengue tem sido objeto de importantes campanhas de saúde pública realizadas nos últimos anos. Os primeiros relatos dessa doença no Brasil datam do século XIX. Entretanto, até a segunda metade do século XX, sua importância foi ofuscada pela febre amarela urbana, outra arbovirose transmitida pelo mesmo mosquito. As campanhas de combate à febre amarela urbana, coordenadas por Emílio Ribas e Osvaldo Cruz entre 1903 e 1923, diminuíram a população do mosquito transmissor *Aedes aegypti*. Após mais de 50 anos sem a ocorrência de epidemias, a doença ressurgiu no Brasil em grande parte devido à desestruturação dos programas de controle de vetores. O ressurgimento da dengue em nosso país ocorreu em 1981-1982, quando foi registrada uma epidemia em Boa Vista (RR), com cerca de 11.000 casos, causada por DENV-1 e DENV-4 (Fonseca and Figueiredo 2005).

No Brasil, em especial na região sudeste, a primeira grande epidemia foi causada pelo DENV-1 e ocorreu nos anos 1986 e 1987 na cidade do Rio de Janeiro, com cerca de 95.000 infectados, espalhando-se para as regiões Nordeste e Centro-

Oeste. Já em 1990, houve a introdução do DENV-2, novamente pelo estado do Rio de Janeiro e, pela primeira vez no Brasil, registrou-se epidemia de dengue com casos graves e óbitos (Schatzmayr *et al.* 1986). Em 1998, foi relatado na cidade de Limeira (SP), um caso de DENV-3 importado da Nicarágua e após dois anos, o DENV-3 foi reintroduzido no estado do Rio de Janeiro (Rocco *et al.* 2001). Em 2002, o DENV-3 produziu uma grande epidemia inicialmente no Rio de Janeiro e depois por todo o país (Nogueira *et al.* 2005). Em contrapartida, o DENV-4 foi isolado em Manaus após 25 anos sem detecção no Brasil (Pinto de Figueiredo *et al.* 2008) e sua reemergência no Brasil foi confirmada em 2010 no estado de Roraima, mesmo local onde ele havia sido inicialmente detectado entre 1981 e 1982 (Osanai *et al.* 1983; Temporao *et al.* 2011) e por fim, em 2012 este sorotipo se espalhou por todo território nacional.

Aproximadamente 5 milhões de casos de dengue ocorreram no Brasil no período de 2002 a 2012. Além disso, o aumento do número de casos ao longo dos últimos anos também trouxe algumas manifestações clínicas não usuais da dengue, incluindo implicações cardíacas, neurológicas, hepáticas e pulmonares, o que pode ser chamado de dengue com complicações. Os números crescentes de FHD e casos de dengue com complicações são preocupantes, já que seus números tem aumentado no país nos últimos 5 anos (SVS, Ministério da Saúde, 2011). Em 2015, segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, foram registrados 1.319.957 casos prováveis de dengue notificados, com maior número concentrado na região Sudeste do país.

Ribeirão Preto (SP) documentou sua primeira epidemia de dengue entre novembro de 1990 e março de 1991, com o isolamento do DENV-1 e a confirmação de 2.305 casos (Rodrigues *et al.* 2002). Entre 1992 a 2000, a incidência da doença manteve-se baixa, com confirmação de casos durante todos os anos, variando de 4 a 317 casos. Em 2001 a incidência da doença voltou a subir, quando o município confirmou 3.190 casos da doença, com isolamento dos sorotipos 1 e 2. Neste mesmo ano, foi notificado o primeiro caso de FHD em Ribeirão Preto, importado do município de Igarapava (SP). No ano de 2002, o sorotipo 3 foi isolado pela primeira vez, de um caso importado. Em 2003, o DENV-3 foi isolado novamente e neste mesmo ano, 8 casos foram classificados como FHD (Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto). Em 2004 e 2005, o número de casos permaneceu baixo, até que em 2006 a cidade de Ribeirão Preto vivenciou uma grande epidemia de dengue, com

notificação de 6.438 casos (Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo). Em 2010, com o retorno da circulação do DENV-1 e DENV-2, houve um grande aumento no número de casos, quando foram notificados 30.159 casos e em 2011, com o estabelecimento do predomínio de DENV-1 foram notificados 20.136 casos. Em 2012, houve uma diminuição significativa com apenas 300 casos, em 2013 foram confirmados aproximadamente 13.000 casos e a prevalência dos sorotipos 1 e 4. Em 2014, o número de casos confirmados da doença chegou a 400 (Dados da Vigilância Epidemiológica de Ribeirão Preto). Por tudo isso, Ribeirão Preto, com uma população de mais de 600.000 habitantes, é considerado um dos municípios polo para controle da dengue pelo Ministério da Saúde. Em 2015, a cidade de Ribeirão Preto registrou 3.061 casos e 2 óbitos de dengue notificados de janeiro a junho com maior número de casos concentrados na região Oeste.

1.3. Manifestações Clínicas

De acordo com a OMS, as infecções por dengue podem ser assintomáticas ou levar a uma febre indiferenciada, a febre da dengue (dengue clássica, DC) ou a febre hemorrágica da dengue (FHD), que pode levar ao choque hipovolêmico (síndrome do choque da dengue, SCD). Após o período de incubação de quatro a oito dias iniciam-se os sintomas, sendo a sintomatologia mais característica: febre, dor de cabeça, dores no corpo e “rash” cutâneo (WHO 1997).

1.3.1. Dengue Clássica

A forma clássica da dengue ou febre da dengue (DC), forma mais comumente encontrada da doença, é caracterizada pelo aparecimento abrupto de febre elevada associada a sintomas inespecíficos, como dor retro-orbitária, cefaleia de grau variável, erupção maculopapular, mialgia, artralgia, dor abdominal, náuseas, vômitos, anorexia e fraqueza. A febre pode ser bifásica, variando de 38,8° C a 40,5° C. Esta fase febril dura 4-7 dias e a maioria dos pacientes se recuperam sem complicações (Whitehorn and Farrar, 2011). A presença de manifestações hemorrágicas, tais como epistaxe, petéquias e gengivorragia podem ser observadas, mas em geral são leves e sem repercussões hemodinâmicas (Fonseca & Figueiredo 2005).

1.3.2. Dengue hemorrágica

A dengue hemorrágica ocorre em 5% dos casos e é caracterizada pelos mesmos sintomas clínicos vistos da dengue clássica, porém evoluem rapidamente para manifestações hemorrágicas, podendo ocorrer também derrames cavitários, instabilidade hemodinâmica e choque. Os casos típicos da FHD são caracterizados por febre alta, fenômenos hemorrágicos, hepatomegalia e insuficiência circulatória. Um achado laboratorial importante é a trombocitopenia com hemoconcentração concomitante. A principal característica fisiopatológica associada à gravidade da FHD é a efusão do plasma, levando à hemoconcentração, que pode ser observada por meio de valores crescentes do hematócrito. Entre as manifestações hemorrágicas, a mais comumente encontrada é a prova do laço positiva. Nos casos graves de FHD, o choque geralmente ocorre entre o 3º e 7º dia de doença, precedido por um ou mais sinais de alerta. O choque é decorrente do aumento da permeabilidade vascular, seguido de hemoconcentração e falência circulatória. É de curta duração e pode levar ao óbito em 12 a 24 horas ou à recuperação rápida após terapia anti-choque apropriada (Ministério da Saúde, 2002).

No Brasil, o Ministério da Saúde tem considerado o termo dengue com complicações (COMP) para casos em que há dificuldade de classificar os pacientes segundo o critério da OMS. Esta classificação é utilizada quando os casos clínicos não se enquadram nos critérios FHD e a classificação DC é insatisfatória. Nesse contexto, a presença de um dos sinais e sintomas a seguir caracteriza o quadro: alterações graves do sistema nervoso, disfunção cardiorrespiratória, insuficiência hepática, contagem de plaquetas igual ou inferior a $50.000/\text{mm}^3$, hemorragia digestiva, derrames cavitários, leucometria global ou inferior a $1.000/\text{mm}^3$ e óbito (SVS, 2008)

Em 2009, uma nova classificação dos casos de dengue foi proposta pela OMS. Por meio da avaliação de um conjunto de parâmetros clínicos e laboratoriais seria possível a distinção entre pacientes que apresentam a dengue grave e pacientes que não apresentam a forma grave (WHO 2009). Os critérios utilizados na nova classificação dos casos de dengue estão apresentados na Figura 5.

Figura 5. Classificação dos casos de dengue e níveis de gravidade de acordo com DENC0 (adaptado WHO, 2009).

1.3.3. Manifestações clínicas incomuns

Algumas manifestações menos comuns podem ocorrer em pacientes com dengue como, por exemplo, miocardite, insuficiência hepática, síndrome de Reye [associada ao uso de medicações contendo ácido acetilsalicílico (AAS) e síndrome da angústia respiratória aguda (SARA)]. Alterações neurológicas têm sido descritas com uma maior frequência nos últimos anos, incluindo polineuropatias, mononeuropatias e síndrome de Guillain-Barré (Ferreira *et al.* 2005; Solomon *et al.* 2000).

Recentemente, tem sido apontado que a dengue pode causar envolvimento neurológico em cerca de 5% dos casos, porém este número provavelmente é subestimado, pois muitos casos de encefalites não são avaliados como suspeita de dengue (Pancharoen & Thisyakorn 2001).

1.4. Imunopatogênese

As causas responsáveis pelo desenvolvimento das formas graves da doença são motivo de discussão nos últimos 50 anos. Os fatores envolvidos na fisiopatologia da doença ainda não estão totalmente esclarecidos e, portanto, as infecções graves bem como o envolvimento da resposta imune na proteção e desenvolvimento da doença não conseguem ser reproduzidos em um modelo animal, o que deixa as pesquisas um pouco limitadas em humanos.

Visto isso, algumas hipóteses já foram propostas para tentar explicar melhor a patogênese da infecção por dengue, porém nenhuma ainda é capaz de explicar e esclarecer todos os mecanismos.

1.4.1. Teoria do aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE)

A hipótese de maior aceitação refere-se a um fenômeno denominado aumento da infecção dependente pelos anticorpos (*antibody-enhancement of infection* – ADE), que preconiza uma associação entre infecções secundárias e o aparecimento de FHD (Halstead 1988; Thein *et al.* 1997; Vaughn *et al.* 2000). Segundo esta hipótese, anticorpos produzidos em infecções prévias por um determinado sorotipo do vírus poderiam não ser neutralizantes ou teriam títulos muito baixos para neutralizarem o sorotipo responsável pela infecção atual. Deste modo, estes anticorpos se ligariam ao sorotipo responsável pela infecção atual, mas não o neutralizaria, formando complexos vírus-anticorpo. Estes complexos, ao serem reconhecidos e internalizados por fagócitos mononucleares por meio dos receptores dirigidos à porção Fc das imunoglobulinas, facilitariam a penetração do vírus em células monocitárias, o que resultaria em uma maior carga viral e maior intensidade da resposta imune com maior liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, o que poderia levar a uma doença mais grave (Figura 6) (Halstead 1988; Halstead 2003).

Figura 6. ADE: Anticorpos produzidos em uma infecção anterior ao se ligarem ao vírus de uma infecção atual, seriam sub-neutralizantes, facilitando a entrada dos vírus nas células e o possível aumento de carga viral, evoluindo para maior gravidade da doença. Fonte: Whitehead *et al.* 2007.

1.4.2. Teoria da interação multifatorial

Alguns autores acreditam que os riscos do desenvolvimento da FHD são multifatoriais, ou seja, além da reatividade cruzada, cepa viral, genética e resposta imune, outros fatores também são considerados para o entendimento da patogênese da dengue. Apesar da alta incidência de infecções secundárias em áreas endêmicas, apenas um pequeno percentual progride para a FHD. Portanto, o ambiente, o hospedeiro e fatores virais também estariam contribuindo para a progressão da doença (Malavige, Fernando, Fernando and Seneviratne 2004). Especula-se, com base nestas observações, que os mecanismos patogênicos da doença englobam uma teoria conciliatória de múltipla causalidade, na qual se incluem os vários fatores de risco relacionados à epidemiologia (imunidade de grupo, intervalo de tempo entre as infecções por diferentes sorotipos), ao indivíduo (idade, sexo, raça, mecanismos genéticos, presença de anticorpos por infecções prévias e intensidade da resposta) e por fim ao vírus (virulência, sorotipos e genótipos envolvidos em cada epidemia e mutações genômicas). Todos estes fatores contribuiriam então, em maior ou menor grau, para o agravamento da doença (Guzman and Kouri 2002). Porém, a grande variabilidade de fatores de risco e a possibilidade de inúmeras combinações entre eles em diferentes cenários em que a doença ocorre, dificultam a identificação de quais mecanismos tem real relevância na fisiopatologia da doença.

1.5. Diagnóstico, tratamento e prevenção

Como os sintomas da dengue são muito semelhantes àqueles presentes em outros quadros febris agudos, a existência de testes laboratoriais específicos é essencial para o cuidado clínico dos pacientes. A confirmação de casos suspeitos é feita com bases clínicas epidemiológicas e testes laboratoriais para detecção do vírus, de antígeno ou RNA viral e anticorpos específicos.

O isolamento viral é considerado o método padrão para o diagnóstico da dengue. Quatro sistemas de isolamento foram desenvolvidos: inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos, o uso de cultura de células de mamíferos, inoculação intratorácica em mosquitos adultos e uso de cultura de células de mosquito (Gubler 1998). A grande limitação das técnicas de isolamento viral é que elas são relativamente laboriosas e demoradas, levando de 7-14 dias para liberação de um resultado final (Gubler 1998; Guzman & Kouri 2004). Técnicas moleculares são capazes de detectar e caracterizar o sorotipo infectante de modo mais rápido que o isolamento, sendo, portanto, ferramentas úteis em investigações epidemiológicas e no planejamento de estratégias de controle de doença (De Paula *et al.* 2002; Lanciotti *et al.* 1992).

A PCR em tempo real também pode ser utilizada, pois além de ser mais rápida que a PCR convencional, oferece baixo risco de contaminação do produto amplificado, realiza a quantificação da carga viral frente a uma curva padrão e apresenta maior sensibilidade que a PCR convencional (Conceição *et al.* 2010; Gomes-Ruiz *et al.* 2006; Prada-Arismendy and Castellanos 2011). Porém, as técnicas moleculares são pouco utilizadas em casos suspeitos fora dos centros de pesquisa, devido ao alto custo para uso rotineiro nos serviços de saúde. Uma alternativa mais barata para o diagnóstico rápido da dengue é o uso do ensaio para detecção da proteína viral NS1 no soro dos pacientes, que pode ser realizada por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) ou imunocromatográficos, sensíveis no diagnóstico da dengue e aplicados no sistema público de saúde (Castro-Jorge *et al.* 2010). Porém, a detecção de anticorpos do tipo IgM por ELISA ainda é a principal ferramenta diagnóstica de infecções por dengue (Peeling *et al.* 2010).

Ainda não existe um tratamento específico para essa doença. Os cuidados aos pacientes baseiam-se no tratamento de suporte aos sintomas observados, como repouso, antipiréticos, analgésicos e a mais importante, administração de fluidos

para hidratação. Na forma hemorrágica, é importante a reposição intensa de fluidos e eletrólitos, monitorada com um simples teste laboratorial como o hematócrito. Se o tratamento for adequado, a taxa de letalidade nos casos de febre hemorrágica cai para menos de 1% (WHO, 2009). Por isso, a implementação de sistemas eficazes de vigilância são de extrema importância e tornou-se uma medida obrigatória para os órgãos de saúde internacionais e países afetados.

O controle do vetor representa a única opção para redução do número de indivíduos acometidos. A eliminação do mosquito adulto geralmente é pouco efetiva, exceto quando o uso de inseticidas é feito dentro das casas (Gubler 1998). Com isso, o combate à proliferação do vetor depende principalmente da eliminação das larvas e de seus respectivos reservatórios. Atualmente, as grandes e médias cidades do Brasil enfrentam limitações no programa de eliminação de criadouros do mosquito. Entre os obstáculos encontrados estão a falta de práticas de fiscalização de pontos estratégicos (borracharias, cemitérios, depósitos de ferro velho, terrenos baldios não cuidados) e a dificuldade de acesso aos domicílios pelos servidores públicos, tanto pela escassez de recursos humanos e financeiros, quanto pela falta de cooperação e envolvimento da população (Tauil *et. al*, 2002).

Recentemente, um grupo de pesquisadores da Austrália em parceria com a Fiocruz, encontrou uma nova arma contra a dengue, a bactéria *Wolbachia*. Esta é capaz de infectar o mosquito transmissor da dengue, diminuindo pela metade o seu tempo de vida e livrando-o do agente causador da doença. Este projeto foi trazido para o Brasil em 2012 pela Fiocruz (Fiocruz, 2013).

Apesar de tantos avanços técnicos referentes à produção de vacinas contra a dengue, existem vários fatores que dificultam a disponibilização de uma vacina que seja ao mesmo tempo eficaz e segura (Halstead, 2012).

Atualmente, no Brasil, há três grupos envolvidos na produção de vacinas para dengue. O Sanofi Pasteur, que já finalizou os testes de fase III, disponibilizará comercialmente a vacina em 2016. Já o Instituto Butantã, que tem o apoio do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos, já finalizou as fases iniciais de testes, porém, o país tem dificuldade em acelerar a produção de uma vacina americano-brasileira. A Fundação Oswaldo Cruz também está desenvolvendo uma vacina, mas ainda não finalizou as fases iniciais de testes (Ministério da Saúde 2015).

Recentemente, uma publicação de vacina em fase de teste IIb/III conduzida em cinco países asiáticos em que a dengue é endêmica, a vacina quimérica da Sanofi Aventis, a CYD dengue tetravalente (TDV), contendo genes do vírus da febre amarela 17D e dos DENV-1 a 4 mostrou um perfil de segurança aceitável de 56%. Contudo, a vacina não conferiu proteção significativa contra o DENV-2 (Sabchareon *et al.*, 2012).

Vacinas contra dengue devem ser testadas quanto à segurança e eficácia, imunizando contra os quatro sorotipos (vacina tetravalente) e evitando o fenômeno de aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE) (Halstead, 2003; Kaufman *et al.* 1987). Deste modo, a capacidade protetora dos candidatos vacinais deve ser avaliada pela produção de anticorpos neutralizantes (Whitehead *et al.*, 2003; Putnak *et al.*, 2005).

Os níveis de produção de anticorpos neutralizantes protetores são medidos pelo ensaio de neutralização da infecção viral em culturas celulares. O ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT) foi adaptado para a dengue na década de 60 (Russell *et al.*, 1967). Nesta técnica, o vírus é incubado com o soro teste e depois a infectividade deste vírus é avaliada em cultura de células por meio da formação de placas, sendo considerado que cada placa origina-se da infecção por um único vírus. As placas são contadas e comparadas ao controle (vírus incubado com solução tampão, como o PBS) para determinar o percentual de redução na infectividade do vírus. Esta forma de detecção é bastante demorada (7 a 10 dias), o que dificulta sua aplicação em larga escala. Novos métodos de neutralização têm sido desenvolvidos visando reduzir o tempo necessário para a realização do teste, além da detecção da infectividade por meio de reações imunoenzimáticas ao invés de formação de placas (WHO, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de tanto conhecimento a respeito da dengue, pouco se sabe sobre como prevenir ou prever o desenvolvimento das formas graves, além de ainda não existir uma vacina com eficácia comprovada contra os quatro sorotipos. Este fato torna-se ainda mais evidente quando se discute quais são os títulos de anticorpos considerados protetores contra uma nova infecção pelo mesmo sorotipo. Diversos fatores relacionados à infecção viral influenciam no desenvolvimento de uma forma mais branda ou mais grave da doença. Após a padronização e análise da técnica de neutralização viral, pode-se estudar a influência dos anticorpos neutralizantes no desenvolvimento das formas graves da dengue, visando definir se eles podem servir como um marcador de proteção ou do desenvolvimento das formas mais graves da doença.

Desta forma, buscou-se neste trabalho padronizar um ensaio de neutralização viral para os quatro sorotipos virais, a fim de ser aplicado em estudos posteriores, visando correlacionar o título dos anticorpos com as alterações fisiopatológicas do paciente, como forma de entender melhor a patogênese da doença. Além disso, será possível aplicar este ensaio nos pacientes que forem submetidos aos ensaios clínicos de proteção vacinal. Para tanto, buscou-se reduzir o número de dias necessários para execução do teste clássico e realizou-se a detecção por meio de RT-PCR em tempo real, para um melhor desempenho do ensaio.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Padronizar uma nova técnica para detecção de anticorpos neutralizantes para os quatro sorotipos virais utilizando a RT-PCR em tempo real.

3.2. Objetivos específicos

- Obter os estoques virais para cada sorotipo viral;
- Realizar titulação viral para cada sorotipo;
- Realizar a transcrição *in vitro* do RNA genômico da proteína E dos vírus da dengue e obter curvas-padrão para a RT-PCR em tempo real;
- Padronizar o ensaio de neutralização viral para todos os sorotipos;
- Realizar teste de reação-cruzada para todos os sorotipos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Vírus

Os DENVs utilizados neste trabalho encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1. Vírus utilizados.

Vírus	Cepa	Origem viral
DENV-1	Mochizuki	Japão
DENV-2	TR1751	Trinidad
DENV-3	BR/SL3/02 (Aquino et al.2006)	São Luís-MA-Brasil
DENV-4	H241	Filipinas

4.2. Estoques virais

4.2.1. Preparo dos estoques virais em cérebros de camundongos

Os vírus utilizados na padronização foram propagados em cérebro de camundongos recém-nascidos. Para tanto, camundongos Swiss recém-nascidos foram inoculados, por via intracerebral, com 20µl da semente de cada DENV citado na Tabela 1. Os camundongos foram observados diariamente, por até 7 dias pós-inoculação, visando à detecção de sinais de encefalite. Os animais doentes foram sacrificados, congelados e, posteriormente, seus cérebros removidos por sucção com seringa estéril. Cada cérebro foi macerado em 900µl de BSA a 4°C e em seguida, centrifugado a 10000 RPM por 10 minutos. Os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados à -70°C.

4.2.2. Preparação dos estoques virais em células C6/36

Os estoques de DENV foram produzidos a partir de cérebro de camundongos infectados, utilizando células de mosquito C6/36 de *Aedes albopictus* (Igarashi, 1978) mantidas a 28°C em meio Leibowitz L-15 (Cultilab®) modificado, suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), 1% de L-glutamina 200Mm (Cultilab®), 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Cultilab®) e 10% de fosfato de triptose (Nutricell® BRL).

Os frascos de células contendo monocamadas celulares foram infectados com 100µl da semente viral e mantidos em estufa por 1 hora para adsorção. Em seguida, o meio L-15 com 2% de SBF foi adicionado e o frasco foi incubado à 28°C. Após um período de 48 a 72 horas, o sobrenadante foi retirado juntamente com a monocamada de células e centrifugado a 1000 rpm, à 4°C por 20 minutos. Ao final, o sobrenadante da cultura celular infectada foi aliquoteado em tubos devidamente identificados que foram armazenados à -70°C.

4.3. Diagnóstico Molecular do Vírus

A confirmação do genoma viral foi realizada por diagnóstico molecular por PCR convencional. Para se obter o RNA viral, uma alíquota de 140µL de cada estoque viral foi extraída utilizando-se o kit QIAamp® Viral RNA (QIAGEN®, Germantown, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A presença de material genético dos vírus foi determinada conforme descrito por Lanciotti *et al.* (1992). Nesta RT-PCR foram utilizados cinco oligonucleotídeos: um *sense*, destinado a uma região do gene que codifica a proteína do capsídeo e que é conservada para os quatro sorotipos, e outros quatro oligonucleotídeos *anti-sense*, complementares às sequências específicas de cada sorotipo. A distinção dos sorotipos é possível, pois a amplificação do material genético referente à cada sorotipo produz fragmentos de diferentes tamanhos (Tabela 2).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados nas amplificações para confirmação dos sorotipos de Dengue.

Oligonucleotídeos	Sequência	Especificidade	Tamanho do fragmento (pb)
D1	5'TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG3'	DENV (sense)	
TS1	5'CGTCTCAGTGATCCGGGGG3'	DENV -1 (anti-sense)	482 (D1 e TS1)
TS2	5'CGCCACAAGGGCCATGAACAG3'	DENV – 2 (anti-sense)	119 (D1 e TS2)
TS3	5'TAACATCATCATGAGACAGAGC3'	DENV – 3 (anti-sense)	290 (D1 e TS3)
TS4	5'CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA3'	DENV – 4 (anti-sense)	392 (D1 e TS4)

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador “GeneAmp PCR System 9700” (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Para o preparo da reação de volume final de 12,5µL foram utilizados 3µL do RNA, 2,5µL da solução tampão 5X *One-Step* RT-PCR (Tris Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 12.5mM MgCl₂, DTT; pH 8.7), 0,5µL de dNTPs (10mM), 0,5µL de cada oligonucleotídeo (10 pmol) e 0,25µL

da mistura de enzimas (QIAGEN *One-Step* RT-PCR Enzyme Mix). A reação de amplificação foi processada utilizando um programa de 50°C por 30 minutos e 95°C por 15 minutos para a transcrição reversa, seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. A etapa final de extensão foi de 10 minutos à 72°C. Os produtos da reação de *one-step* RT-PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2% (Invitrogen, Carlsbad, EUA), em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). O gel foi corado com Gel Red (Biotium, Hayward, EUA) e visualizado utilizando o equipamento Alpha Imager EC Gel Documentation (Alpha Innotech, San Leandro, EUA).

4.4. Titulação viral

Para quantificação do vírus, realizou-se a titulação viral por PFU (Unidades Formadoras de Placa) que mede a capacidade dos vírus de formar placas infecciosas por unidade de volume. Para a realização da titulação, os vírus foram submetidos a diluições seriadas em MEM sem suplementação com SFB e 250µL foram inoculados em células Vero mantidas em meio MEM (Cultilab®), suplementado com 10% de SFB (Cultilab®), 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Cultilab®), à 37°C em ambiente de 5% de CO₂ por 1 hora. Como solução que impede infecção de outras células e destruição da monocamada celular (overlay), foi utilizado carboxi-metilcelulose (CMC) a 1%. Após 10 dias de incubação, as placas foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 1%. As placas formadas foram contadas para, então, determinar qual o título de cada cepa viral de cada sorotipo.

4.5. Obtenção das curvas padrão

4.5.1. Produção de clones para DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4

Uma região de aproximadamente 1.000 pb da proteína E foi escolhida para a transcrição *in vitro*. Apesar do produto da amplificação da PCR em Tempo Real ter apenas 75 pb, foi transcrito um fragmento maior do genoma viral de forma a deixar o ensaio mais real. Foram escolhidos 4 isolados de pacientes caracterizados quanto

ao sorotipo presente em nosso laboratório (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), que foram amplificados com oligonucleotídeos listados na Tabela 3.

Tabela 3. Relação de oligonucleotídeos utilizados nas amplificações para a clonagem de cada sorotipo e tamanho dos fragmentos gerados.

Oligonucleotídeos	Sequência	Sorotipo	Tamanho (pb)
SS	5' GGTACTGGAGCATGGAAG3'	DENV-1	1124
AT	5' CTGCTTCCCTTCTTGAACC 3'		
D2PRM	5' GAACATGTGCACCCTCATG 3'	DENV-2	967
D2R543	5' GAGAGCACTCCATCGTG 3'		
D3SeqF2	5' CCACTGAAGCCATCTTGCCTGA 3'	DENV-3	1160
D3RNS1	5' TTGTTGACCTAATTCCGCACACTC 3'		
D4F1	5' TATGATTGGGCAAACAGGAATCC 3'	DENV-4	1533
D4R1	5' AGAGTGAATTCCTCCAACAGCTAT 3'		

Esta RT-PCR foi realizada em um volume de 25µL, com 5µL do RNA viral, 5µL da solução tampão 5X *One-Step* RT-PCR (Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 12.5 mM MgCl₂, DTT; pH 8.7), 1µL de dNTPs (10mM), 1µl de cada oligonucleotídeo (10 pmol) e 0,5µL da mistura de enzimas (QIAGEN *One-Step* RT-PCR *Enzyme Mix*). As reações de amplificação foram processadas utilizando um programa de 50°C por 30 minutos e 95°C por 15 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minuto. A etapa final de extensão foi de 10 minutos à 72°C. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e purificados do gel utilizando-se o kit Wizard® SV *Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, EUA).

Os produtos da RT-PCR foram ligados em vetor de clonagem InstAclone (Thermo Scientific), pela ação da T4 DNA Ligase (Promega, Madison, EUA) e incubados por 16 horas a 4°C. A reação de ligação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos das reações de ligação foram transformados por choque térmico em bactérias *E. coli* (DH5α) ultra-competentes. As colônias brancas que cresceram em placas de LB Agar (Invitrogen, Carlsbad, EUA) com 100µg/mL de ampicilina (Gibco-BRL, Gaithersburg, EUA), 35µL de Xgal (50mg/mL) (Promega, Madison, EUA) e 14 µL de IPTG (0,8M) (Invitrogen) foram selecionadas e propagadas em 2,0mL de meio LB líquido (Invitrogen, Carlsbad, EUA) com 100µg/mL de ampicilina (Gibco, Gaithersburg, EUA) por 16 horas sob agitação de

4.5.2. Transcrição *in vitro*

Cerca de 1µg de DNA cada clone de DENV-1, DENV-2 DENV-3 e DENV-4 foi linearizado com a enzima de restrição para realização da transcrição *in vitro*. Os clones de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 foram clivados com *SacI* (New England Biolabs) e DENV-4 com *EcoRI* (New England Biolabs). A reação de clivagem, realizada em um volume final de 20µL, foi purificada pela adição de 1µL de EDTA 0,5M, 2µL de acetato de amônio 5M e 40µL de etanol 100%. Esta mistura foi incubada por 20 minutos a -20°C e o DNA foi precipitado por centrifugação a 18000g por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e o DNA foi ressuspensão em 8µL de água livre de RNases e DNases. A clivagem total dos clones foi comprovada por eletroforese em gel de agarose e aproximadamente 800ng de plasmídeo foram utilizados na transcrição *in vitro* com o kit MEGAscript T7 (Ambion®) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante, com exceção do tempo de tratamento com DNase, que foi aumentado para 8 horas, uma vez que quinze minutos não foram suficientes para degradar todo o DNA plasmidial usado como molde na transcrição. Os RNAs gerados foram purificados com kit MEGAClear™ (Ambion®) de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% (Invitrogen, Carlsbad, EUA) adicionado de 600µL de tiocianato de guanidina 1M. As amostras e o marcador de RNA de 0,24-9,5Kb (Invitrogen, Carlsbad, EUA) foram aquecidos à 70°C por 5 minutos com o *Gel Loading Buffer II* (95% formamida, 0.025% xileno cianol, 0.025% azul de bromofenol, 18 mM EDTA e 0.025% SDS) e aplicados no gel. A corrida foi realizada em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) a 90V, o gel foi corado com *Gel Red* (Biotium, Hayward, EUA) e visualizado utilizando o equipamento *Alpha Imager EC Gel Documentation* (Alpha Innotech, San Leandro, EUA). A presença de DNA no RNA transcrito foi afastada por meio de RT-PCR em tempo real.

4.5.3. RT-PCR em tempo real

Para a realização da RT-PCR em tempo real, foram desenhados *primers* e sondas específicos para a detecção dos sorotipos, todos inseridos dentro da proteína estrutural E e analisados por meio de ferramentas de bioinformática (Tabela 4).

As reações de amplificações foram feitas utilizando-se o kit TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Foram utilizados 5µL do reagente *TaqMan Universal Master Mix II*, 2,5µL dos RNAs transcritos, 0,25µL dos oligonucleotídeos específicos (25nM), 0,125µL da sonda e 1,875µL de água, totalizando um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Foram utilizados como curva padrão somente os RNAs que não apresentaram amplificação de DNA.

Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos e sondas utilizados na construção de curvas-padrão.

Oligonucleotídeos	Sequência	Sonda	Sorotipo	Tamanho (pb)
FD1	5'GCACCAGGTGGGAAACGA3'	CTACAGAACATGGAACAAT	DENV -1	75
RD1	5'TAGGAGCTTGAGGTGTTATGG3'			
FD2	5'CTAAATGAAGAGCAGGACAAAAGGT3'	TGCAAACACTCCATGGTA	DENV – 2	72
RD2	5'ATCCATTCCCCATCCTCTGT3'			
FD3	5'GAGCTATGCAATGTGCACGAA3'	TTTGTGTTGAAGAAAGAAGT	DENV – 3	70
RD3	5'TATTGTCCCATGCTGCGTTTC3'			
FD4	5'GGTGCTGGAGCTCCGTGTA3'	TCCCATAGAGATAAGAGAT	DENV – 4	70
RD4	5'CGCGCCCAACCACTTTT3'			

Os transcritos foram quantificados por espectrofotometria no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) para o cálculo do número de moléculas de RNA/µL (<http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>) e foram diluídos para as concentrações finais de 10^8 a 10^1 cópias de transcritos/3µL para utilização como padrões. As reações de amplificações foram realizadas utilizando-se 3µL de RNA, 2µL do reagente QuantiTect Virus Master Mix (QIAGEN®, Germantown, EUA), 0,1µL do reagente QuantiTect Virus RT Mix, 0,25µL dos oligonucleotídeos (10pmol), 0,125µL da sonda (10pmol), e água para completar o volume final de 10µL. Para as reações de amplificação do DENV-2 foi utilizado 0,38µL dos oligonucleotídeos (10pmol) e 0,38µL da sonda (10pmol). As condições de amplificação foram: 50°C por 30 min e 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. A reação foi executada no aparelho 7500 FastReal-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Os resultados foram analisados com o software 7500 Software v. 2.0.1 (Applied Biosystems, City, EUA), tendo como base o valor de CT (*cycle threshold*), que corresponde ao número de ciclos em que é atingido o limiar da detecção da

fluorescência emitida pelo fluoróforo liberado da sonda durante a reação de PCR em tempo real. A curva padrão possibilitou, por extrapolação, o cálculo do número de cópias em 3µL de RNA. Para se obter o número de cópias/mL de amostra, o valor obtido foi multiplicado por 142,8571429 (conversão para 60µL de RNA eluído, extraído de 140µL de amostra).

4.6. Padronização do ensaio de neutralização por RT-PCR real

4.6.1. Perfil de replicação viral

Para se saber qual o comportamento do vírus ao se replicar e o melhor dia para a coleta, foi realizado um perfil de replicação para os quatro sorotipos virais. A partir da titulação viral de cada um dos vírus, foi calculado o valor de MOI (Multiplicidade de Infecção Viral) que é dependente da proporção entre a quantidade de vírus infecciosos presentes no inóculo e a quantidade de células utilizadas, porém esses valores podem variar entre um vírus e outro. Para este estudo, foram utilizados 4 MOI's diferentes: 0,1; 0,5; 1 e 3, calculados a partir da titulação viral por PFU/mL. Para cada sorotipo viral, um valor para o respectivo MOI foi encontrado que diferenciou nos volumes, pois cada vírus obteve uma titulação (PFU/mL) diferente. Células Vero mantidas em meio MEM (Cultilab®), suplementado com 10% de SFB (Cultilab®), 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Cultilab®), a 37°C em ambiente de 5% de CO₂ foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1×10^5 células/poço. As células foram infectadas com 200µL/poço dos vírus nos diferentes MOIs em duplicata e incubados em estufa a 37° C por 1 hora para ocorrer a adsorção viral nas células sendo agitadas em períodos de 15 minutos. Após a incubação, esse inóculo de infecção foi retirado, as células foram lavadas com solução salina (PBS 1x) e foi adicionado 1mL de meio de manutenção MEM, suplementado com 2% de SFB e incubadas em estufa a 37°C. O sobrenadante das células foi coletado diariamente dentro do período de 24 horas até 120 horas. Para cada MOI e para cada hora coletada, foi separado 140ul de sobrenadante e o RNA viral foi extraído com o kit QIAamp® Viral RNA (QIAGEN®, Germantown, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, e quantificado por RT-PCR em tempo real com o kit QuantiTect Virus Master Mix (QIAGEN®, Germantown, EUA) nas mesmas condições de concentração e ciclagem da construção das curvas padrão, as quais também foram

utilizadas como padrão na quantificação do perfil de replicação de cada sorotipo (Figura 9). O ensaio foi realizado em triplicata para cada sorotipo e analisado no programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

Figura 9. Perfil de replicação viral em modelo esquemático.

4.6.2. Ensaio de neutralização viral para cada sorotipo

O ensaio de neutralização viral para cada sorotipo DENV foi realizado a partir da concentração de MOI de 0,5 e o tempo de coleta do sobrenadante foi de cinco dias (120 horas). Para este ensaio, células Vero mantidas em meio MEM (Cultilab®, suplementado com 10% de SFB (Cultilab®), 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Invitrogen®) à 37°C em ambiente de 5% de CO₂ foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1x10⁵ células/poço e incubadas a 37°C em ambiente de 5% de CO₂. Para cada sorotipo, a MOI de 0,5 foi utilizado no preparo da mistura viral, e o volume de vírus utilizado para cada mistura foram 87,5µL para DENV-1, 125µL para DENV-2, 330µL para DENV-3 e 100µL para o DENV-4. Fluidos ascíticos de camundongos imunizados com cada sorotipo (MIAF), previamente confeccionados em nosso laboratório, foram utilizados nesse trabalho. Os MIAFs foram incubados a 56°C por 1 hora para inativação do sistema complemento e submetidos a diluições em meio MEM (Cultilab®), sem suplementação com SFB e 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Cultilab®). As diluições de 1:10 a 1:5120 foram incubadas com a mistura viral de cada sorotipo a 37°C por 1 hora em estufa para que ocorresse a interação vírus e anticorpo. Após incubação, as células foram infectadas com 200µL por poço da mistura vírus/MIAF e incubadas em estufa por 1 hora a 37°C para ocorrer a adsorção viral nas células. Os controles do ensaio se deram por incubação do vírus com PBS e o do MIAF com PBS. O inóculo foi retirado após a incubação com a mistura vírus/MIAF e as células foram lavadas com

1mL de PBS para então ser adicionado 1mL de MEM com 2% de SFB como meio de manutenção das células. A coleta dos sobrenadantes das células foi realizada após cinco dias (120 horas) e 140µl do sobrenadante foi aliqotado para a extração do RNA viral e posteriormente RT-PCR em tempo real (Figura 10). O ensaio foi realizado em triplicata para cada sorotipo e analisados no programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

Figura 10. Ensaio de neutralização viral em modelo esquemático.

4.6.3. Ensaio neutralização de reação-cruzada

Este ensaio foi realizado para verificar se há reação cruzada entre os sorotipos DENV quando submetidos à incubação com anticorpos (MIAF) dengue. Para isso, cada MIAF específico para um sorotipo do vírus DENV foi submetido a diluições seriadas e para cada diluição foi realizada uma incubação com os quatro sorotipos virais. Células Vero mantidas em meio MEM (Cultilab®), suplementado com 10% de SFB (Cultilab®), 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Invitrogen®), à 37°C em ambiente de 5% de CO₂, foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1x10⁵ células/poço. A técnica consistiu na diluição seriada decimal a partir de 100µL de cada MIAF (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) que foi de 1:10 a 1:1280 em meio MEM (Cultilab®), sem suplementação com SFB e 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Cultilab®) e a mistura viral para cada sorotipo foi em feita em MOI 0,5 nos mesmo volumes do ensaio de neutralização anterior. Cada diluição de cada um dos MIAF's foi incubada com 100µl da mistura viral dos quatro sorotipos à 4°C *overnight*, para que ocorresse a interação vírus e anticorpo. Como controles da placa, também foi incubado, nas mesmas condições, PBS com o vírus de cada sorotipo viral em MOI 0,5 e cada MIAF com seu sorotipo específico. Após esse período, os 200µl foram infectados em células e incubados por 1 hora à

37°C para que a adsorção viral acontecesse. Em seguida, as células foram lavadas com 1mL de PBS 1x e mantidas com meio MEM com 2% de SFB. A coleta dos sobrenadantes celulares foi realizado após 48 horas e seu RNA viral extraído para, então, a RT-PCR em tempo real ser realizada frente às curvas-padrão de cada sorotipo (Figura 11). Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Graphpad Prism 6.0.

Figura 11. Ensaio neutralização de reação-cruzada em modelo esquemático.

5. RESULTADOS

5.1. Estoques virais e detecção molecular

Os estoques virais de cada sorotipo foram submetidos à RT-PCR convencional para a confirmação viral. Utilizando os primers propostos por Lanciotti *et al.* (1992), foi possível caracterizar o genoma dos vírus utilizados nesse trabalho (Figura 12).

Figura 12. Caracterização molecular dos vírus: Gel de agarose a 2%, 80V/1hora. M: marcador molecular 100pb (Fermentas), C: controle negativo, D1: DENV-1 (482pb), D2: DENV-2 (119pb), D3: DENV-3 (290pb), D4: DENV-4 (389pb).

5.2. Titulação viral

A quantificação viral nos estoques foi feita por teste de *plaque forming units*: Unidades Formadoras de Placa (PFU/mL). Plaques, individualizados e claramente visíveis à diluição, foram contados como é mostrado na figura 13. Observaram-se os títulos entre $1,2 \times 10^5$ para o DENV-3 e $1,4 \times 10^7$ para o DENV-1, todos com 10 dias de incubação como mostra a Tabela 5.

Para o DENV-3, as diluições dos vírus estão representadas nas fileiras A e B e vão de 10^{-1} à 10^{-6} , podendo-se realizar a contagem de placas até a penúltima diluição.

Figura 13. Ensaio de placa para titulação dos vírus dengue. As diluições decimais da semente viral, em duplicata, permitiram contar os plaques e determinar o título de $1,5 \times 10^5$ PFU/mL para o DENV-3.

Tabela 5. Titulação viral dos quatro sorotipos DENV

Sorotipos	Titulação viral
DENV-1	$1,4 \times 10^7$ PFU/mL
DENV-2	$1,0 \times 10^7$ PFU/mL
DENV-3	$1,5 \times 10^5$ PFU/mL
DENV-4	$1,2 \times 10^7$ PFU/mL

5.3. Obtenção de curvas padrão

As curvas-padrão foram construídas pelo método de Taqman (Applied Biosystems), utilizando *primers* e sondas específicas para o gene da proteína E do vírus dengue. Para realização das curvas, o RNA transcrito foi utilizado como

parâmetro e, para isso, o RNA obtido foi aquele proveniente do plasmídeo contendo o DNA do produto de clonagem gênica.

Para a realização da transcrição *in vitro*, a inserção correta dos fragmentos de RT-PCR foi confirmada por sequenciamento para os quatro sorotipos e o plasmídeo foi linearizado com enzimas de restrição (Figura 14).

Figura 14. Produto da linearização dos plasmídeos: *Sacl* (A) e *EcoRI* (B) em gel de agarose 0,8%. M: marcador de peso molecular 1Kb Fermentas, PD1: clone de DENV-1, PD2: clone de DENV-2, PD3: clone de DENV-3, PD4: clone DENV-4, LD1: clone de DENV-1 linearizado, LD2: clone de DENV-2 linearizado, LD3: clone de DENV-3 linearizado e LD4: clone DENV-4 linearizado.

A qualidade do RNA transcrito foi avaliada e então este foi testado para a presença de DNA contaminante. Após a confirmação da pureza do RNA por RT-PCR em tempo real, confirmando a ausência de DNA no transcrito, este foi quantificado por espectrofotometria e submetido à diluições seriadas decimais em que o cálculo do número de moléculas de RNA/ μL foi realizado pelo <http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr> (concentração final 10^8 a 10^1 cópias de transcritos/ $3\mu\text{L}$). As diluições foram inseridas no software 7500 Fast Real-Time PCR System para construção da curva padrão (Figura 15). A curva padrão expressa os valores da inclinação, intersecção e correlação da reta, no canto inferior direito (Figura 15B). O coeficiente de correlação (R^2) das curvas foi excelente, variando de 0,993 a 1.

Figura 15. Análise das curvas padrão para DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DENV-4. A. Curva de amplificação da reação de RT-PCR em tempo real para o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, utilizando diluições seriadas decimais do RNA transcrito. Valor de ΔRn no eixo Y e ciclo da reação no eixo X. B, Curva padrão com o valor de Ct (Ciclo do limiar) no eixo Y e o número de cópias no eixo X. No lado inferior direito, estão expressos os valores de inclinação da reta, intersecção, correlação e eficiência da reação.

5.4. Padronização do ensaio de neutralização por RT-PCR em tempo real

5.4.1. Perfil de replicação

Os perfis de replicação para os quatro sorotipos virais foram realizados com os MOIs de 0,1; 0,5; 1,0 e 3,0. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados diariamente em um período de 24 a 120 horas. Cada perfil foi realizado em triplicata (n=3) e após a extração de RNA viral e a realização da RT-PCR em tempo real, os dados foram analisados em programa estatístico Prisma 6.0 e os gráficos estão representados na Figura 16.

Analisando cada perfil de replicação separadamente, podemos notar que para o DENV-1, o MOI 0,1 apresentou menor quantificação quando comparados com os de 0,5 e 1,0 que tiveram quantificações semelhantes e o de 3,0 com quantificação superior. Para o DENV-2, os MOIs 0,1; 0,5 e 1,0 apresentaram quantificação

semelhante exceto no tempo de 72 horas para o MOI 1,0. Já para o DENV-3, as quantificações para todos os MOIs foram bem semelhantes, com um declínio no período de 96 horas para o MOI 0,5. No perfil DENV-4, notou-se maior quantificação no MOI 1,0 do que no de 3,0 no tempo de 48 horas e os MOIs de 0,5 e 3,0 foram semelhantes a partir de 48 horas. Apesar de algumas diferenças nas quantificações de cada perfil, o tempo de 120 horas (5 dias) mostra-se como um ponto de encontro das curvas e a tendência ao *plateau*, o que também pode ser observado em outros períodos, como o de 48 e 72 horas, que seriam suficientes para as coletas dos sobrenadantes.

Figura 16. Perfil de replicação para os quatros sorotipos virais: Todas as cepas virais foram avaliadas frente à multiplicidade de infecção viral (MOI) em cinco dias de coletas.

5.4.2. Ensaio de neutralização viral para cada sorotipo

Com base nos resultados dos perfis de replicação, realizou-se o ensaio de neutralização viral para cada sorotipo do DENV. Neste ensaio, em que o vírus é incubado com um anticorpo dengue-específico, obteve-se o título de anticorpos considerados neutralizantes frente ao vírus. O MOI escolhido para os quatro sorotipos foi o de 0,5 por ser uma concentração intermediária, não utilizando grande quantidade de vírus e o tempo de coleta escolhido foi o de 120 horas, que apresenta

tendência ao *plateau*. Cada ensaio de neutralização foi realizado em triplicata (n=3) e os dados dos três experimentos foram analisados no programa Graphpad Prism 6.0 em que uma curva de regressão não linear de inibição dose-resposta de quatro parâmetros (*log[inhibitor] vs. response – Variable slope [four parameters]*) foi aplicada. Muitas das curvas de dose-resposta de inibição têm uma inclinação padrão de -1.0. Este modelo não assume uma inclinação padrão, mas se encaixa no gráfico a partir dos dados, e por isso é chamado de modelo de inclinação variável. Isso é preferível quando se tem uma abundância de pontos e dados (Figura 17).

Cada diluição dos anticorpos (MIAFs) foram submetidos à conversão logarítmica que variou de 0 – 4. Para cada gráfico e consequentemente cada sorotipo viral, foi observado o Log IC₅₀ que mediu a capacidade de neutralização de 50% da carga viral frente ao anticorpo. Para os quatro sorotipos dos DENV, o IC₅₀ foi calculado. Para o DENV-1 (Figura 16A), o IC₅₀ foi o Log₂,61 que corresponde a um título de 1:400. Para o DENV-2 (Figura 16B), o IC₅₀ foi o Log₂,1 que corresponde a um título de 1:130. Para o DENV-3 (Figura 16C), o IC₅₀ foi o Log 2,5 que corresponde a um título de 1:320 e, por fim, para o DENV-4 (Figura 16D) o IC₅₀ foi o Log₂,2 que corresponde a um título de 1:160.

Figura 17. Ensaio de neutralização viral para cada sorotipo: vírus submetidos ao seu anticorpo específico (MIAF) para obtenção de título de neutralização viral (IC_{50}). A) Neutralização DENV-1 B) Neutralização DENV-2 C) Neutralização DENV-3 D) Neutralização DENV-4. O título de anticorpos neutralizantes ficou entre o log 2 e 3, o que variou em um título de 1:100 a 1:400.

5.4.3 Ensaio neutralização de reação-cruzada

Para cada MIAF de cada sorotipo DENV, foram realizadas diluições decimais que variaram de 1:10 a 1:1280. Cada diluição foi incubada com os quatro sorotipos virais a 4°C *overnight* para que ocorresse a interação vírus-anticorpo para posteriormente infectar células Vero. Após o período de 48 horas, os sobrenadantes das culturas celulares coletados foram submetidos à extração do RNA viral para então realizar a RT-PCR em tempo real.

Os resultados foram avaliados pelo programa estatístico Graphpad Prism 6.0 como descrito anteriormente. Para cada diluição, houve a conversão logarítmica, que variou de 1,0 – 3,1 em que foi encontrado o valor de Log IC_{50} e a partir dele, aplicado uma equação que calcula o valor de IC_{90} . Esse tipo de equação permite calcular qualquer valor de inibição a partir do valor de 50%, ajustando-se aos dados obtidos (<http://graphpad.com/quickcalcs/Ecanything1.cfm>). Os valores de IC_{90} obtidos

estão representados na Tabela 6. Nesta tabela, os vírus estão representados na primeira coluna e os anticorpos estão na primeira linha. Cada anticorpo foi incubado com os quatro vírus dengue e um título neutralizante foi encontrado. Os valores da tabela demonstram que os títulos de anticorpos neutralizantes foram superiores quando submetidos à incubação com seu sorotipo específico para o DENV-1, DENV-3 e DENV-4 com os valores de 1:160, 1:200 e 1:125, respectivamente, mostrando-se mais eficientes na neutralização viral de seu anticorpo específico, fato que não é observado para o anticorpo DENV-2 em que surpreendentemente seu título neutralizante de 1:80 foi inferior ao incubado com o vírus DENV-4, demonstrando que o anticorpo para DENV-2 neutralizou mais o vírus DENV-4, possivelmente reflexo de uma reação-cruzada entre os sorotipos ou uma inespecificidade do anticorpo. Os valores neutralizantes obtidos dos anticorpos com os outros sorotipos foram inferiores em sua maioria, porém todos eles apresentaram reação-cruzada, sendo os maiores títulos desta reação cruzada para os vírus que sabidamente são mais próximos antigenicamente, como por exemplo os anticorpos contra o DENV-1 com aqueles específicos ao vírus DENV-3. Dentre todos os valores mostrados, o anticorpo que apresentou maior título neutralizante e menor reação-cruzada, foi o DENV-3.

Tabela 6. Título de anticorpos neutralizantes incubados com os quatro sorotipos dengue.

Vírus/MIAF	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
DENV-1	1:160	1:16	1:63	1:80
DENV-2	1:10	1:80	1:10	1:25
DENV-3	1:65	1:32	1:200	1:99
DENV-4	1:100	1:94	1:40	1:125

6. DISCUSSÃO

A dengue é a mais importante arbovirose que afeta o ser humano, constituindo um sério problema de saúde pública no mundo. A interação vírus-hospedeiro é complexa e desencadeia diferentes sintomas clínicos que vão desde a forma assintomática ou subclínica até as formas graves da doença. A patogênese da dengue decorre de uma interação entre fatores virais e fatores do hospedeiro, porém a forma como esta interação acontece ainda não é totalmente compreendida. A avaliação da heterogeneidade entre as apresentações clínicas em populações diferentes representa uma área vital de pesquisa para entender melhor esta interação. Uma melhor compreensão da patogênese da dengue iria auxiliar no desenvolvimento de vacinas, abordando questões específicas sobre segurança e eficácia, à luz do papel do sistema imunológico, no desenvolvimento da doença clínica.

Vários estudos na Ásia e América Latina identificaram a infecção secundária, por um sorotipo diferente do vírus responsável pela primeira infecção, como um fator epidemiológico de risco para o desenvolvimento de infecções mais graves pelos vírus dengue (Burke *et al.* 1988; Endy *et al.* 2002; Kouri *et al.* 1989; Kyle and Harris 2008; Sangkawibha *et al.* 1984). A principal explicação para aumento do risco de doença grave em infecções secundárias é a de que anticorpos não neutralizantes, de reação cruzada, produzidos durante a infecção primária, se ligariam ao vírus e aumentariam a infecção de células que apresentassem receptor Fc. Este fenômeno, denominado ADE (aumento da infecção dependente de anticorpos), potencialmente aumenta o risco de desenvolvimento de doença grave em virtude do aumento do número de células infectadas e, por conseguinte, aumento da viremia (Halstead 2003). Contudo, o risco de desenvolvimento de dengue grave não é completamente explicado somente pela presença de infecções secundárias, mas, a gravidade da doença parece ser determinada por uma combinação de fatores do hospedeiro e fatores virais, incluindo a genética da cepa infectante viral (Balmaseda *et al.* 2006).

Os quatro sorotipos da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), podem causar dengue grave. Em áreas endêmicas para dengue, como é o caso do Brasil, é comum que haja oscilações na prevalência de cada sorotipo, e, atualmente, todos os

sorotipos estão circulando simultaneamente no país, no entanto a dinâmica de circulação varia de região para região (Ministério da Saúde 2013).

Geralmente, um sorotipo de dengue é dominante por um período de dois a seis anos, após o qual ele sofre um declínio na prevalência quando um sorotipo diferente emerge para substituí-lo (Adams *et al.* 2006; Rabaa *et al.* 2010). Provavelmente, a diminuição na prevalência de um sorotipo pode ser devida ao acúmulo de imunidade da população, de tal forma que, o número de hospedeiros susceptíveis disponíveis é diminuída.

Atualmente, nenhuma vacina está disponível. Algumas vacinas vêm sendo testadas tanto de vírus inativados quanto de quimeras e encontram-se em fase II e III dos ensaios clínicos. No entanto, algumas destas vacinas requerem regimes de imunização longos de até 1 ano para o desenvolvimento de imunidade para os 4 sorotipos. (Durbin *et al.* 2011). Cada vez mais busca-se alternativas na produção de vacinas, tais como aquelas baseadas em vírus inativados purificados, DNA e proteínas recombinantes do envelope viral (Sabchareon *et al.* 2012).

O principal imunógeno para induzir anticorpos neutralizantes é a proteína E, no entanto, esses anticorpos apresentam reatividade cruzada com outros sorotipos DENV. A proteína E dos vírus dengue atua na ligação ao receptor celular e fusão da membrana e por isso, é uma das proteínas mais importantes na neutralização viral. Os anticorpos neutralizantes dirigidos à proteína E são cruciais na mediação de proteção homóloga contra reinfecção (Roherig *et al.* 1998).

Embora a resposta anti-DENV seja denominada por anticorpos anti-E, estudos mostraram que anticorpos anti-prM também eram dominantes em infecções primárias e secundárias. Tais anticorpos foram observados como sendo altamente reativos de forma cruzada e não neutralizantes, portanto há um risco do desenvolvimento das formas mais graves da dengue (Rodenhuis-Zybert *et al.* 2010).

PRNT é o ensaio padrão ouro para medir anticorpos neutralizantes. Uma das desvantagens do método é o tempo necessário de obtenção de resultados, pois, para os DENVs o período de incubação pode variar de 7-10 dias, e, portanto, torna-se difícil utilizar para ensaios de vigilância e de vacinas em larga escala. Além disso, há a dificuldade de algumas cepas virais causarem o aparecimento de plaques e sempre existe a possibilidade de contaminação das culturas de células. Dessa forma, a padronização de uma nova técnica para detecção de anticorpos neutralizantes foi de suma importância, pois além de se reduzir o número dias de

execução do teste, ele permitiu a realização de vários sorotipos ao mesmo tempo e um grande número de diluições.

Técnicas de Biologia Molecular e em especial as de amplificação do ácido nucléico, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), vêm sendo gradativamente aceitas e estabelecidas nos laboratórios clínicos e de pesquisa. Alguns dos motivos para a maior aceitação dessas técnicas seriam a alta sensibilidade, especificidade e rapidez, demandando menor tempo para a liberação do resultado, o que pode ser decisivo no tratamento de muitas doenças.

Para a padronização da RT-PCR em tempo real, o kit *QuantiTect Virus Kit* (QIAGEN®, Germantown, EUA) utilizado já havia sido testado no Laboratório de Virologia Molecular em relação à sua maior sensibilidade na detecção viral quando comparado ao *Taqman One-Step RT-PCR Master Mix Reagents* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Além disso, os oligonucleotídeos e sondas específicos foram desenhados para os quatro sorotipos seguindo as instruções de otimização para o desenvolvimento de um teste altamente sensível. Por meio da análise do alinhamento nucleotídico de cerca de 15 cepas de cada sorotipo viral (sendo que destas 10 eram de isolados brasileiros) foi escolhida a região da proteína estrutural E para a amplificação, região que se encontra os mais importantes domínios antigênicos.

O Laboratório de Virologia Molecular já possuía anteriormente uma reação padronizada de RT-PCR para análise da carga viral que amplifica um segmento genômico da região 3'- não codificadora (3'NC) (Gomes-Ruiz, Nascimento, de Paula & da Fonseca 2006), porém apresentava pouca sensibilidade para amostras clínicas de DENV-3 com carga viral baixa. Por esta razão construímos novos oligonucleotídeos e sondas, e utilizamos amostras de pacientes ao invés de cepas laboratoriais para a construção da curva padrão, de forma a deixar o ensaio mais fidedigno.

As cepas virais utilizadas neste estudo (Tabela 1) apresentaram somente a amplificação do genoma de cada sorotipo viral (Figura 12), ou seja, eram amostras virais puras entre os sorotipos (Figura 12), o que foi de extrema importância para avaliação de reação cruzada na padronização do ensaio de neutralização.

Os perfis de replicação viral foram essenciais para se avaliar os dias de coleta dos sobrenadantes das culturas celulares e o tempo de 48 horas para o ensaio de neutralização de reação cruzada foi suficiente para se avaliar a capacidade de

neutralização dos anticorpos, tempo menor que o da técnica do PRNT e segundo alguns estudos que utilizaram essa técnica, o tempo médio de incubação variou 5-8 dias de incubação (Morens *et al.* 1985; Thomas *et al.* 2009; Timiryasova *et al.* 2013; Sirivichayakul *et al.* 2014; Salje, *et al.* 2014; Tang *et al.* 2015), tempo relativamente maior que a técnica utilizada no presente trabalho.

Tanto o ensaio de neutralização quanto o ensaio de reação-cruzada, utilizaram a mesma metodologia diferenciando apenas no período e temperatura da incubação vírus-anticorpo que foi de 1 hora/ 37°C para o ensaio de neutralização e 4°C/ *overnight* para o comparativo. É sabido que ambas as metodologias são funcionais e quando se tem uma maior quantidade de amostras, torna-se mais simplificado a incubação *overnight*. Os resultados dos testes foram corroborados com as curvas-padrão previamente construídas pela técnica de transcrição *in vitro*, o que tornou o ensaio mais fidedigno.

Os títulos neutralizantes mostrados da Tabela 6 indicam que há reação-cruzada entre os anticorpos para cada sorotipo viral. A reação cruzada é normalmente observada em ensaios de PRNT e microneutralização. Vorndan & Beltran realizaram testes de PRNT e microneutralização observando que soros incubados com cada sorotipo dos vírus dengue apresentavam reações cruzadas das mais variadas, destacando-se as com maior frequência aqueles anticorpos incubados com os vírus dengue 1, 2 e 4 ((Vorndan & Beltran, 2002), fato que também pode ser observado em nosso trabalho.

Anticorpos produzidos para DENV-4 têm sido pouco descritos sobre a eficácia de neutralização. Um estudo realizado por Morens *et al.* demonstrou que de 19 anticorpos contra DENV-4 testados, apenas 1 conseguiu neutralizar de maneira eficaz o vírus por PRNT. Yamananka *et al.* em seu estudo de anticorpos DENV, mostrou que de 43 anticorpos para DENV-4, apenas 2 conseguiram neutralizar o vírus. Porquê a resposta anti-DENV4 é pouco específica é incerta, mas há um questionamento na dificuldade de identificação de inibidores anti-DENV4 quando se utiliza ensaios de neutralização convencionais. Em um recente estudo de reação-cruzada, anticorpos DENV-4 foram testados frente à incubação com os outros sorotipos dengue por PRNT, 23% foram eficazes na neutralização dos sorotipos 1, 2 e 3 e 15% apresentaram reação cruzada com o DENV-2 (Sukupolvi-Petty *et al.* 2013). Esses resultados concordam com o nosso estudo em que o anticorpo DENV-4 obteve valores neutralizantes próximos quando incubados aos outros sorotipos.

Um estudo realizado em Bangkok relatou surtos epidêmicos dos quatro sorotipos dos vírus dengue desde a década de 50. Analisando as epidemias, o estudo revelou um padrão distinto com os sorotipos 1, 2 e 3, que acontecem ao mesmo tempo, e uma epidemia isolada para o DENV-4, que ocorre nos anos seguintes e após realizar análise filogenética dos vírus em amostras colhidas ao longo do período de 20 anos, mostrou que há reação-cruzada entre os sorotipos, especificamente entre DENV-1 e DENV-4 quando comparadas aos outros dengue, e que, as reações cruzadas observadas refletem nos períodos das epidemias (Adams *et al.* 2006).

Em um recente estudo, anticorpos monoclonais anti-DENV produzidos contra a proteína E do vírus a partir de soro de pacientes para os quatro sorotipos virais, foram testados quanto à reação-cruzada por ELISA. Os resultados obtidos mostraram que 84% dos anticorpos reagiram com todos os sorotipos, 13% reagiram com dois ou três sorotipos e apenas 3% com um único sorotipo (Denjirattisai *et al.* 2015), demonstrando, dessa forma, que outras formas de neutralização também apresentam reação cruzada entre os sorotipos dengue.

Vários estudos recentes têm encontrado evidências para apoiar a existência de reação cruzada entre sorotipos de dengue, que podem durar de 5-12 meses (Salje *et al.* 2012), 1-3 (Ohainle *et al.* 2011) e quatro meses a 9 anos (Gibbons *et al.* 2007). Outras pesquisas têm fornecido evidências que a presença de títulos de anticorpos neutralizantes heterólogos e patogenicidade de infecções secundárias, estão correlacionadas com o tempo de duração de uma infecção primária. No entanto, nenhuma dessas pesquisas estima explicitamente a duração de uma proteção cruzada (Hubert and Halstead, 2009). Em vez disso, eles calculam a duração de tempo entre as infecções subsequentes em indivíduos, ou o período que se tem maior distância na ocorrência de diferentes sorotipos dentro de uma população (Salje *et al.* 2012).

Albert Sabin, pioneiro nos estudos de reação-cruzada, observou que indivíduos convalescentes à infecção por DENV-1, apresentavam proteção para o DENV-2 de três meses até nove meses e que quanto mais curto o intervalo entre as infecções, maior a proteção. Fenômenos semelhantes foram observados em uma vacina viva atenuada DENV-1 em cérebros de camundongos durante uma epidemia em 1963 em Porto Rico que garantiu uma proteção de 39% contra DENV-3 (Bellanti *et al.* 1966).

Uma das explicações para possíveis reações cruzadas entre os sorotipos dengue é a proteína E do vírus. Exposta na superfície dos vírus dengue maduros é o único alvo de anticorpos neutralizantes devido sua posição conformacional, além disso, é relativamente conservada exibindo cerca de 65% de sua identidade da sequência de aminoácidos quando comparando os sorotipos DENV mais distantes. O possível aumento de gravidade da doença por infecção secundária e a necessidade para ter proteção contra os quatro sorotipos, define uma urgência na produção de vacinas para proteger contra este rápido crescimento da doença (Baht *et al.* 2013). Todas as vacinas contra DENV em desenvolvimento têm como objetivo aumentar o título de anticorpos neutralizantes e a proteína E é o principal foco. Um ensaio de uma vacina viva atenuada tetravalente contra DENV resultou em uma eficácia de 30,2% com quase nenhuma eficácia para DENV-2, apesar de seu estímulo de produção de anticorpos *in vitro* contra os quatro sorotipos. Um segundo estudo também mostrou pouca eficácia contra DENV-2. Existe uma necessidade de investigar a resposta dos anticorpos após infecção natural DENV, bem como após vacinação, para entender a correlação de marcador de proteção. O reconhecimento de partículas DENV por anticorpos é complicado por apresentar conformações diferentes do vírus em cada fase do ciclo (Mukhopadhyay *et al.* 2005).

Outra hipótese para justificar reações cruzadas entre sorotipos dengue vem da análise filogenética dos vírus. A maioria das filogenias mostram que o DENV-4 divergiu primeiro, seguido do DENV-2, e por fim o DENV-1 e o DENV-3 (Weaver & Vasilakis, 2009). As pequenas diferenças no genoma viral entre isolados de DENV de diferentes regiões geográficas em várias áreas endêmicas do mundo possibilitou, então, dividir um sorotipo em classes ou clados intrasorotípicos (chamados genótipos) utilizando o sequenciamento parcial de regiões do genoma viral (Fernandez *et al.* 2011; Klungthong *et al.* 2011; Lanciotti *et al.* 1994, 1997; Rico-Hesse, 1990; Rico-Hesse *et al.* 1997). O DENV-4 é particularmente interessante, pois foi o primeiro sorotipo a divergir em análises filogenéticas do gênero *Flavivirus* (Kuno *et al.* 1998; Weaver & Vasilakis, 2009) de modo que esse sorotipo pode ter desenvolvido características fenotípicas únicas (Klungthong *et al.*, 2004). Análises iniciais revelaram que cepas de DENV-4 exibiram maior conservação de sequências do que outros sorotipos do DENV (92%) e 96-100% de conservação de aminoácidos na proteína E. Mukhopadhyay *et al.*, 2005 ao classificar os *Flavivirus*, demonstrou que filogeneticamente os sorotipos 1 e 3 apresentam maior semelhança entre si, fato

que pode ser observado em nosso trabalho em que anticorpo DENV-1 quando incubado ao vírus DENV-3 obteve praticamente o mesmo título neutralizante quando comparado ao anticorpo DENV-3 incubado com o vírus DENV-1 (Tabela 6). Já foi proposto que a estrutura filogenética dos vírus dengue reflete em processos concorrentes. Por um lado, a imunidade protetora cruzada pode aumentar a distância genética entre os vírus de diferentes sorotipos por selecionar variantes que escapem da reação cruzada (Adams *et al.* 2006). Por outro lado, o ADE pode ocorrer apenas em vírus que são geneticamente similares (Grenfell *et al.* 2004).

Apesar de encontrarmos valores semelhantes na neutralização entre os sorotipos, o que indica a presença de reação-cruzada entre sorotipos dos vírus dengue, este trabalho tem grande importância no que diz respeito a padronização de uma nova técnica de neutralização por RT-PCR. Através dele, foi possível a redução de dias necessários para detecção de anticorpos neutralizantes quando comparados com a neutralização convencional (PRNT). Além disso, as técnicas de biologia molecular são altamente sensíveis e específicas, como a RT-PCR em tempo real. Acreditamos que o teste de neutralização padronizado terá aplicabilidade no estudo de candidatos vacinais e eficácia de vacinas que poderão estar disponíveis em breve, além da aplicação no estudo do papel dos anticorpos neutralizantes na proteção contra a dengue.

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir neste trabalho que a padronização de um teste de neutralização por RT-PCR em tempo real foi realizada com sondas e primers específicos para a proteína E do vírus dengue, região altamente envolvida na neutralização viral. As curvas-padrão foram construídas a partir do RNA transcrito *in vitro*, a partir de amostras de isolados de pacientes, o que tornou o ensaio mais fidedigno. A padronização da neutralização viral foi baseada no perfil de replicação do vírus, para determinar o dia de coleta do sobrenadante, que foi de 48 horas, tempo menor do que o utilizado para a técnica considerada padrão ouro da neutralização viral, o PRNT.

No ensaio de neutralização-cruzada, os títulos neutralizantes para os anticorpos incubados com seu sorotipo específico foram maiores em três dos quatro sorotipos e apresentou reação-cruzada principalmente entre os sorotipos 1,2 e 4. A padronização de um ensaio de neutralização mais sensível e rápido foi de suma importância e pode ter aplicabilidade em estudos futuros de candidatos vacinais. O único resultado a ser criticado neste trabalho é a reatividade maior ao DENV-4 quando esperávamos a maior reatividade ao DENV-2.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, B., E. C. HOLMES, C. ZHANG, M. P. MAMMEN, JR., et al. Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Sep 19 2006, 103(38), 14234-14239.
- AQUINO, V. H., E. ANATRIELLO, P.F. GONÇALVES, E. V. DA SILVA, et al. Molecular Epidemiology of Dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, Oct 2006, 75(4), 710-715.
- AVIRUTNAN, P., R. E. HAUHART, P. SOMNUKE, A. M. BLOM, et al. Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation. **Journal of Immunology**, Jul 2011, 187(1), 424-433.
- BALMASEDA, A., S. N. HAMMOND, L. PEREZ, Y. TELLEZ, et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mar 2006, 74(3), 449-456.
- BARTENSCHLAGER, R. AND S. MILLER Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Microbiology**, Apr 2008, 3(2), 155-165.
- BELLANTI, J. A., A.T.C BOURKE, E.L. BUESCHER, F.C. CADIGAN et al. Report of dengue vaccine trial in the Caribbean, 1963: a collaborative study. **Bull WHO**, 1966, 35 (1), 93.
- BHATT, S., P.W. GETTING, O.J. BRADY et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, Apr 2013; 496, 504–507.
- BRINTON, M. A. Replication of flaviviruses. In S. SCHLESINGER AND M.J. SCHLESINGER eds. *The Togaviridae and Flaviviridae*. **New York: Plenum Press**, 1986, p. 327-365.
- BRINTON, M. A. AND J. H. DISPOTO. Sequence and secondary structure- analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. **Virology**, Feb 1988, 162(2).
- BURKE, D. S., A. NISALAK, D. E. JOHNSON AND R. M. SCOTT A PROSPECTIVE-STUDY OF DENGUE INFECTIONS IN BANGKOK. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Jan 1988, 38(1), 172-180.

CASTRO-JORGE, L. A., P. R. L. MACHADO, C. A. FAVERO, M. C. BORGES, et al. Clinical Evaluation of the NS1 Antigen-Capture ELISA for Early Diagnosis of Dengue Virus Infection in Brazil. **Journal of Medical Virology**, Aug 2010, 82(8), 1400-1405.

CHAMBERS, T. J., C. S. HAHN, R. GALLER AND C. M. RICE FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. **Annual Review of Microbiology**, 1990, 44, 649-688.

CLYDE, K., J. L. KYLE AND E. HARRIS Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, Dec 2006, 80(23), 11418-11431.

CONCEICAO, T. M., A. T. DA POIAN AND M. H. F. SORGINE A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. **Journal of Virological Methods**, Jan 2010, 163(1), 1-9.

DA COSTA FARIA, N. R.; R.M.R. NOGUEIRA, A. M. B. DE FILIPPIS, et al. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Mar 2013, 7 (3).

DE PAULA, S. O., R. J. P. NETO, J. CORREA, S. R. ASSUMPCAO, et al. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, May-Jun 2002, 96(3), 266-269.

DEJNIRATTISAI, W. et al. A new class of highly potent broadly neutralizing antibodies isolated from dengue viremic patients. **Nature Immunol.** Dec 2014, 16, 170-177.

DOWD, K. A., T.C. PIERSON. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. **Virology**, Mar 2011, 411(2), 306–315.

DURBIN, A. P., M. J. VARGAS, K. WANIONEK, S. N. HAMMOND, et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. **Virology**, Jul 5 2008, 376(2), 429-435.

DURBIN, A. P., B.D. KIRKPATRICK, K. K. PIERCE, A.C. SCHIMIDT, et al. Development and clinical evaluation of multiple investigational monovalent DENV vaccines to identify components for inclusion in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. **Vaccine**, Sep 2010, 29 (42): 7242-7250.

DURBIN, A. P. et al. Next-Generation Dengue Vaccines: Novel Strategies Currently Under Development. **Viruses**, 2011, 3, 1800-1814.

ENDY, T. P., A. NISALAK, S. CHUNSUTTIWAT, D. H. LIBRATY, et al. Spatial and temporal circulation of dengue virus serotypes: A prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American Journal of Epidemiology**, Jul 1 2002, 156(1), 52-59.

FERNANDEZ, J. et al. Detection of dengue virus type 4 in Easter Island, Chile. **Archives of Virology**, 2011.

FERREIRA, M. L. B., C. G. CAVALCANTI, C. A. COELHO AND S. D. MESQUITA Neurological manifestations of dengue: study of 41 cases. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, Jun 2005, 63(2B), 488-493.

FLAMAND, M., F. MEGRET, M. MATHIEU, J. LEPAULT, et al. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **Journal of Virology**, Jul 1999, 73(7).

FONSECA, B. A. L. AND L. T. M. FIGUEIREDO. Dengue. In R. VERONESI AND R. FOCCACIA eds. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Livraria Atheneu, 2005, p. 343-356.

GIBBONS, R. V. AND D. W. VAUGHN Dengue: an escalating problem. **British Medical Journal**, Jun 29 2002, 324(7353), 1563-1566.

GOMES-RUIZ, A. C., R. T. NASCIMENTO, S. O. DE PAULA AND B. A. L. DA FONSECA SYBR green and TaqMan real-time PCR assays are equivalent for the diagnosis of dengue virus type 3 infections. **Journal of Medical Virology**, Jun 2006, 78(6), 760-763.

GRENFELL, B.T., O.G. PYBUS, J.R. GOG, J.L.N WOOD et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. **Science**, Jan 2004, 5656 (303), 327-332.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Jul 1998, 11(3), 480-+.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever as a public health problem in the 21st century. **New Challenges to Health: the Threat of Virus Infection**, 2001, 60, 247-267.

GUBLER, D. J. The Economic Burden of Dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, May 2012, 86(5), 743-744.

GUZMAN, M. G., S. B. HALSTEAD, H. ARTSOB, P. BUCHY, et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, Dec 2010, S7-S16.

GUZMAN, M. G. AND G. KOURI Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, Jan 2002, 2(1), 33-42.

GUZMAN, M. G. AND G. KOURI Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, Mar 2004, 8(2), 69-80.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue – Challenges to molecular- biology. **Science**, Jan 29 1988, 239(4839), 476-481.

HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Flaviviruses: Pathogenesis and Immunity**, 2003 2003, 60, 421-467.

HALSTEAD, S. B. Dengue vaccine development: a 75% solution? **Lancet**, Nov 3 2012, 380(9853), 1535-1536. HEINZ, F. X. AND S. L. ALLISON The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. **Current Opinion in Microbiology**, Aug 2001, 4(4).

HEINZ, F. X., H. HOLZMANN, ESSL A., M. KUNDI. Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. **Vaccine**, May 2007, 25 (43), 7559–7567.

HEINZ, F.X., K. STIASNY, G. PUSCHNER-AUER, H. HOLZMANN, et al. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. **Virology**, Jan 1994, 198(1), 109–117.

HENCHAL, E. A. AND J. R. PUTNAK THE DENGUE VIRUSES. **Clinical Microbiology Reviews**, Oct 1990, 3(4), 376-396.

HUANG, K. J., Y. C. YANG, Y. S. LIN, J. H. HUANG, et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Journal of Immunology**, Mar 1 2006, 176(5).

HUBERT, B., S.B. HALSTEAD. Dengue 1 virus and dengue hemorrhagic fever, French Polynesia, 2001. **Emerg Infect Dis**. Aug 2009, 15(8):1265-70.

IGLESIAS, N.G. AND A. V. GAMARNIK. Dynamic RNA structures in the dengue virus genome. *RNA Biology*, Mar 2011, 8(2), 249-257.

JESSIE, K., M. Y. FONG, S. DEVI, S. K. LAM, et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Journal of Infectious Diseases**, Apr 15 2004, 189(8), 1411-1418.

JUNJHON, J., T. J. EDWARDS, U. UTAIPAT, V. D. BOWMAN, et al. Influence of pr-M Cleavage on the Heterogeneity of Extracellular Dengue Virus Particles. **Journal of Virology**, Aug 15 2010, 84(16).

JUNJHON, J., M. LAUSUMPAO, S. SUPASA, S. NOISAKRAN, et al. Differential Modulation of prM Cleavage, Extracellular Particle Distribution, and Virus Infectivity by Conserved Residues at Nonfurin Consensus Positions of the Dengue Virus pr-M Junction. **Journal of Virology**, Nov 2008, 82(21).

KAUFMAN, B.M., P. L. SUMMERS, D. R. DUBOIS, K. H. ECKELS. Monoclonal antibodies against dengue 2 virus e-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Mar 1987, (36), 427–434.

KOU, Z., M. QUINN, H. CHEN, W. W. S. I. RODRIGO, et al. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Medical Virology**, Jan 2008, 80(1), 134-146.

KOURI, G., M. G. GUZMAN, L. VALDES, I. CARBONEL, et al. Reemergence of dengue in Cuba: A 1997 epidemic in Santiago de Cuba. **Emerging Infectious Diseases**, Jan-Mar 1998, 4(1), 89-92.

KUHN, R. J., W. ZHANG, M. G. ROSSMANN, S. V. PLETNEV, et al. Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, Mar 2002, 108(5), 717-725.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v. 72(1), p. 73-83, 1998.

KLUNGTHONG et al. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. **Virology**, v. 329, p. 168–179, 2004.

KLUNGTHONG et al. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. **Journal of Virological Methods**, v. 154, p. 175–181, 2008.

KYLE, J. L. AND E. HARRIS Global Spread and Persistence of Dengue. **Annual Review of Microbiology**, 2008 2008, 62, 71-92.

LAI, C.-Y., W.-Y. TSAI, S.-R. LIN, C.-L. KAO, 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**, Jul 2008, 82(13).

LANCIOTTI, R. S., C. H. CALISHER, D. J. GUBLER, G. J. CHANG, et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical- samples by using reverse transcriptase-polymerase chain-reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Mar 1992, 30(3), 545-551.

LIBRATY, D. H., T. P. ENDY, H. S. H. HOUNG, S. GREEN, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **Journal of Infectious Diseases**, May 1 2002a, 185(9), 1213-1221.

LINDENBACH, B. D. AND C. M. RICE. **Molecular biology of flaviviruses**. Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution, 2003 2003, 59.

LORENZ, I. C., S. L. ALLISON, F.X. HEINZ, A. HELENIUS. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. **J Virol**, Jun 2002, 76(11), 5480– 5491.

MACKENZIE, J. S., D. J. GUBLER AND L. R. PETERSEN Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, Dec 2004, 10(12), S98-S109.

MALAVIGE, G. N., S. FERNANDO, D. J. FERNANDO AND S. L. SENEVIRATNE Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, Oct 2004, 80(948), 588-601.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2013. Disponível em:

http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_diagnostico_manejo_clinico_adulto.pdf

MODIS, Y., S. OGATA, D. CLEMENTS AND S. C. HARRISON. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Jun 10 2003, 100(12).

MONATH, T. P. DENGUE – The risk to developed and developing-countries.. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Mar 29 1994, 91(7), 2395-2400.

MORENS, D. M, S. B. HALSTEAD, P. M. REPIK, R. PUTVATANA et al. Simplified Plaque Reduction Neutralization Assay for Dengue Viruses by Semimicro Methods in BHK-21 Cells: Comparison of the BHK Suspension Test with Standard Plaque Reduction Neutralization. **Journal of Microb.** Aug. 1985, 22 (2): 250-254.

MUKHOPADHYAY, S., R. J. KUHN AND M. G. ROSSMANN A structural perspective of the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, Jan 2005, 3(1), 13-22.

MURPHY, F. Togavirus morphology and morphogenesis. In R.W. SCHLESINGER ed. The Togaviruses: Biology, Structure, Replication. **New York: Academic Press**, 1980, p. 687.

NOGUEIRA, R. M. R., H. C. SCHATZMAYR, A. M. B. DE FILIPPIS, F. B. DOS SANTOS, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, Sep 2005, 11(9), 1376-1381.

OHAINLE, M., A. BALMASEDA, A. R. MACALALAD, Y. TELLEZ, M. C. ZODY et al. Dynamics of Dengue Disease Severity Determined by the Interplay Between Viral Genetics

and Serotype-Specific Immunity. **Science Translational Medicine**, Dec 2011, 3 (114): 114-128

OSANAI, C., A. TRAVASSOS DA ROSA, A. TANG, R. DO AMARAL, et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 1983, 25(1), 53-54.

PALUCKA, A. K. Dengue virus and dendritic cells. **Nature Medicine**, Jul 2000, 6(7), 748-749.

PANCHAROEN, C. AND U. THISYAKORN Neurological manifestations in dengue patients. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 2001, 32(2), 341-345.

PEELING, R. W., H. ARTSOB, J. L. PELEGRINO, P. BUCHY, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, Dec 2010, S30-S37.

PIERSON, T. C., D.H. FREMONT, R. J. KUHN, M. S. DIAMOND. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. **Cell host & microbe**, Sep 2008, 4(3), 229–238.

PIERSON, T. C. AND M. C. DIAMOND. Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses. **Current Opinion of Virology**, Apr 2012, 2(2), 168–175.

PINTO DE FIGUEIREDO, R. M., F. G. NAVECA, M. D. S. BASTOS, M. D. N. MELO, et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Apr 2008, 14(4), 667-669.

PRADA-ARISMENDY, J. AND J. E. CASTELLANOS Real time PCR. Application in dengue studies. **Colombia Medica**, Apr-Jun 2011, 42(2), 243-258.

RABAA, M. A., H. VU THI TY, B. WILLS, J. FARRAR, et al. Phylogeography of Recently Emerged DENV-2 in Southern Viet Nam. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Jul 2010, 4(7).

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

RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, p. 244–251, 1997.

ROBERT PUTNAK, J., B. A. COLLIER, G. VOSS, D. VAUGHN et al. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine**, Aug 2005, 23(35), 4442 – 4452.

ROCCO, I., B. KAVAKAMA AND C. SANTOS First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 2001, 43(1), 55-57.

RODENHUIS-ZYBERT, I A.; H. M . VAN DER SSCHAAR, J. M . DA SILVA et al. Immature dengue virus: a veiled pathogen? **PLoS Pathogens**, Jan 2010, 6 (1).

RODHAIN, F. AND L. ROSEN. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In D.J. GUBLER AND G. KUNO eds. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **New York, USA: CAB International**, 1997, p. 45-60.

RODRIGUES, E. M. S., A. L. DAL-FABRO, R. SALOMAO, I. B. FERREIRA, et al. Epidemiologia da infecção pela dengue em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Rev. Saude Pública** 2002, 36, 160-165.

ROEHRIG, J. T., R. A. BOLIN AND R. G. KELLY Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. **Virology**, Jul 5 1998, 246(2).

ROEHRIG, J. T., L. A. STAUDINGER, A.R. HUNT, J. H MATHEWS et al. Antibody prophylaxis and therapy for flavivirus encephalitis infections. **Ann N Y Acad Sci**, Dec 2001, 951, 286–297.

RUSSELL, P.K; A. NISALAK, P. SUKHAVACHANA, S. VIVONA. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. **Journal of Immunology**, Mar 1967, 99(2), 285-290.

SABCHAREON, A.; D. WALLACE, C. SIRIVICHAYAKUL, K. LIMKITTIKUL, et al. Protective efficacy of the recombinant, liveattenuated, CYDtetraivalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **Lancet**, Nov 2012, 380 (9853): 1559-1567.

SABIN, A. B. RESEARCH ON DENGUE DURING WORLD WAR II. **Am J Trop Med Hyg**, 1952, 1(1), 20.

SALJE, H. et al. Revealing the micro-scale spatial signature of dengue transmission and immunity in an urban population. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, Apr 2012, 109(24), 9535–9538.

SALJE, H et al. Variability in Dengue Titer Estimates from Plaque Reduction Neutralization Tests Poses a Challenge to Epidemiological Studies and Vaccine Development. **PLoS Negl Trop Dis**. Jun 2014, 8 (6): 29-52.

SANGKAWIBHA, N., S. ROJANASUPHOT, S. AHANDRIK, S. VIRIYAPONGSE, et al. Risk-factors in dengue shock syndrome- A prospective epidemiologic-study in rayong, Thailand. I. The 1980 Outbreak. **American Journal of Epidemiology**, Nov 1984, 120(5), 653-669.

SAÚDE, M. D. Cartilha da dengue [online]. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010. Available from World Wide Web: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html>.

SCHATZMAYR, H., R. NOGUEIRA AND A. TRAVASSOS DA ROSA An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1986, 81(2), 245-246.

SCHERER, W. F. COMPLEXITY OF ARBOVIRUS NOMENCLATURE - A PROPOSAL TO SIMPLIFY IT. **American Journal of Epidemiology**, 1968, 88(2), 145-&.

SHEPARD, D. S., L. COUDEVILLE, Y. A. HALASA, B. ZAMBRANO, et al. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Feb 2011, 84(2).

SIRIVICHAYAKUL, C., A. SABCHAREON, K. LIMKITTIKUL, S. YOKSAN. Plaque reduction neutralization antibody test does not accurately predict protection against dengue infection in Ratchaburi cohort, Thailand. **Virol J**. Mar 2014; 11 (48).

SOLOMON, T., N. M. DUNG, D. W. VAUGHN, R. KNEEN, et al. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, Mar 25 2000, 355(9209), 1053-1059.

SUKUPOLVI-PETTY, S., S. K. AUSTIN, M. ENGLE, J. D. BRIEN, et al. Structure and Function Analysis of Therapeutic Monoclonal Antibodies against Dengue Virus Type 2. **Journal of Virology**, Sep 15 2010, 84(18).

SUKUPOLVI-PETTY, S., J. D. BRIEN, S.K. AUSTIN, B. SHRESTHA et al. Functional analysis of antibodies against dengue virus type 4 reveals strain-dependent epitope exposure that impacts neutralization and protection. **J. Virol.** Aug 2013, 87 (16) 8826-8842.

TANG, C. T. et al. Generation of Monoclonal Antibodies against Dengue Virus Type 4 and Identification of Enhancing Epitopes on Envelope Protein. **PLoS One.** Aug. 2015. 10 (8).

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle de dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, 2002, 18(3), 867-871.

TEMPORAO, J. G., G. O. PENNA, E. H. CARMO, G. E. COELHO, et al. Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, May 2011, 17(5), 938-940.

TIMIRYASOVA, T. M., M. I. BONAPARTE, P. LUO, R. ZEDAR, B. T. HU and S. W. HILDRETH. Optimization and Validation of a Plaque Reduction Neutralization Test for the Detection of Neutralizing Antibodies to Four Serotypes of Dengue Virus Used in Support of Dengue Vaccine Development. **Am J Trop Med Hyg.** May 2013; 88(5): 962–970.

THEIN, S., M. M. AUNG, T. N. SHWE, M. AYE, et al. Risk factors in dengue shock syndrome. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, May 1997, 56(5), 566-572.

THOMAS, S.J., A. NISALAK, K. B. ANDERSON, D. H. LIBRATY et al. Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. **Am J Trop Med Hyg.** Nov 2009; 81(5): 825–833.

VAUGHN, D. W., S. GREEN, S. KALAYANAROOJ, B. L. INNIS, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **Journal of Infectious Diseases**, Jan 2000, 181(1), 2-9.

VON SYDOW, F. F. O., M. A. SANTIAGO, P. C. NEVES-SOUZA, D. I. S. CERQUEIRA, et al. Comparison of dengue infection in human mononuclear leukocytes with mosquito C6/36 and mammalian vero cells using flow cytometry to detect virus antigen. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, Jul-Aug 2000, 95(4), 483-489.

VORNDAM, V., M. BELTRAN. Enzyme-linked immunosorbent assay-format microneutralization test for dengue viruses. **Am J Trop Med Hyg**, Feb. 2002, 66 (2): 208-12.

WAHALA, W. M. P. B., A. A. KRAUS, L. B. HAYMORE, M. A. ACCAVITTI-LOPER, et al. Dengue virus neutralization by human immune sera: Role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, Sep 15 2009, 392(1).

WEAVER, S.C., N. VASILAKIS. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infect Genet Evol**. Feb 2009 9(4):523-40.

WENGLER, G. Terminal Sequences of the genome and replicative-form RNA of the Flavivirus West Nile Virus- Absence of poly(A) and possible role in RNA replication. **Virology**, 1981, 113 (2)

WESTAWAY, E. G., M. A. BRINTON, S. Y. GAIDAMOVICH, M. C. HORZINEK, et al. Flaviridae. **Intervirology**, 1985 1985, 24(4).

WHITEHORN, J., J. FARRAR. Dengue. **Clin Med**, Jul 2011, (11),483–487.

WHITEHEAD, S.S., E. J. BLANEY, A. P. DURBIN, B. R. MURPHY. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology*. Jul 2007,(5),518-528.

WHITEHEAD, S. S., K. A. HANKLEY, J. E. BLANEY, L. E. GILMORE et al. Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys. **Vaccine**, Oct 2003, 21(27-30), 4307-4316.

WHO. Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment and control. In. Geneva: **World Health Organization**, 1997, p. 84.

WHO (2007) Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. WHO/IVB/07.07. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_IVB_07.07_eng.pdf.

WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. In. **Switzerland: TDR/World Health Organization**, 2009, p. 147.

WU, S. J. L., G. GROUARD-VOGEL, W. SUN, J. R. MASCOLA, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, Jul 2000, 6(7), 816-820.

YAMANAKA, A., T. KOTAKI, E. KONISHI. A Mouse Monoclonal Antibody against Dengue Virus Type 1 Mochizuki Strain Targeting Envelope Protein Domain II and Displaying Strongly Neutralizing but Not Enhancing Activity. **J. Virol.** Dec 2013, 87 (23): 12828-12837.

ZHANG, Y., J. CORVER, P. R. CHIPMAN, W. ZHANG, et al. Structures of immature flavivirus particles. **Embo Journal**, Jun 2003, 22(11), 2604-2613.

ZHENG, A., M. UMASHANKAR AND M. KIELIAN In Vitro and In Vivo Studies Identify Important Features of Dengue Virus pr-E Protein Interactions. **Plos Pathogens**, Oct 2010, 6(10).

ZYBERT, I. A., H. VAN DER ENDE-METSELAAR, J. WILSCHUT AND J. M. SMIT Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. **Journal of General Virology**, Dec 2008, 89.