

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE COM TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL PARA  
QUANTIFICAÇÃO DOS VÍRUS QUIMÉRICOS FA17D/DEN1, 2, 3, 4  
CANDIDATOS A VACINA TETRAVALENTE CONTRA A DENGUE

**ALINE MARTINS CARDOSO COELHO**

Rio de Janeiro

2013



# INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ALINE MARTINS CARDOSO COELHO

Padronização da técnica de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real para quantificação dos vírus quiméricos FA17D/DEN1, 2, 3, 4 candidatos a vacina tetravalente contra a Dengue

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

Rio de Janeiro

2013

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Departamento VDTEC, sob orientação da Dra. Sheila Maria Barbosa de Lima e da Dra. Elena Cristina Caride Siqueira Campos.



INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS  
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ALINE MARTINS CARDOSO COELHO

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE COM TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL PARA  
QUANTIFICAÇÃO DOS VÍRUS QUIMÉRICOS FA17D/DEN1, 2, 3, 4  
CANDIDATOS A VACINA TETRAVALENTE CONTRA A DENGUE

Orientadoras: Dra. Sheila Maria Barbosa de Lima e Dra. Elena Cristina Caride Siqueira Campos

Dissertação aprovada em 27 de março de 2013

Examinadores:

Dra. Ana Maria Bispo de Filippis  
IOC / FIOCRUZ

Dr. Luciane Almeida Amado  
UEZO

Dra. Ana Paula Dinis Ano Bom  
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2013

Dedico este trabalho à minha mãe.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos e ao Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos, por me concederem a oportunidade de cursar um mestrado de qualidade e a VDTEC e ao LATEV por me alocarem e permitirem que eu desenvolvesse este projeto em sua área física, além de me fornecerem todo o material necessário para tanto.

Agradeço às minhas orientadoras Dra. Sheila Maria Barbosa de Lima e Dra. Elena Cristina Caride Siqueira Campos, pela liberdade e confiança referentes a este trabalho, além do apoio, amizade e ajuda ao longo de todo o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço à Dra. Márcia Archer por me acolher no seu projeto e à Dra. Anna Maya Yoshida por me dar a oportunidade de desenvolver este trabalho no LATEV.

Agradeço à toda equipe do LATEV, que sempre se mostrou pronta a ajudar e fez momentos sérios e dias difíceis mais divertidos. Em especial ao Dr. Leonardo Diniz e à Dra. Gisela Trindade, que participaram da minha banca de qualificação e foram de extrema importância em etapas cruciais do projeto, me ajudando sempre que possível.

Agradeço aos colegas do MPTI, que estiveram comigo em longas horas de aulas e também ajudaram muito, em especial ao André Prucoli, ao Gustavo Mendes e à Aline Guimarães, que com certeza são amigos que carregarei para toda vida.

Agradeço aos meus amigos da Biomedicina UFF, que continuam tão presentes como se ainda estivéssemos cursando a faculdade e são os mais divertidos do mundo. Mas especialmente, aos que eu mais amo, Gabriella Moura, Helena Miguens, Matheus Sathler, Maurício Pereira e Thaysse Leite, e que sempre me apoiaram incondicionalmente, até mesmo durante minhas crises.

Agradeço, principalmente, à minha mãe, que mesmo não entendendo bem o que eu faço, me ajuda e me dá forças em todas as fases e situações da minha vida, e sem a qual eu não vivo.

"Investir em conhecimento rende sempre os melhores juros."

- *Benjamin Franklin*

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	14
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O DENV .....	1
1.1.1. Sorotipos e genótipos do DENV .....	6
1.2. Ciclo de transmissão do vírus .....	8
1.3. Sintomatologia da Dengue.....	9
1.4. Epidemiologia da Dengue.....	11
1.5. Diagnóstico laboratorial do Dengue .....	18
1.6. Profilaxia.....	22
1.7. Uso do vírus amarílico vacinal 17D como vetor de expressão de proteínas heterólogas para produção de vacinas.....	24
1.7.1. Quimeras de Dengue .....	26
1.8. Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) .....	29
1.8.1. <i>SYBR<sup>®</sup> Green</i> .....	34
1.8.2. <i>TaqMan<sup>®</sup></i> .....	36
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. Objetivo Geral: .....	39
2.2. Objetivos Específicos: .....	39
3. METODOLOGIA.....	40
3.1. Cultivo e manutenção de células Vero .....	40
3.2. Produção de estoques virais das quimeras.....	41
3.3. Curvas de propagação viral .....	42
3.4. Titulação viral.....	42
3.5. Desenho dos oligonucleotídeos .....	43
3.6. Extração de RNA viral .....	45
3.7. Curva padrão .....	45
3.8. Otimização da concentração dos oligonucleotídeos da RT-qPCR.....	46
3.8.1. RT-qPCR sistema <i>TaqMan<sup>®</sup></i> em duas etapas .....	46
3.8.2. RT-qPCR sistema <i>SYBR Green<sup>®</sup></i> etapa única.....	47
3.9. RT-qPCR .....	48
3.9.1. RT-qPCR sistema <i>TaqMan<sup>®</sup></i> etapa única .....	48
3.9.2. RT-qPCR sistema <i>SYBR<sup>®</sup> Green</i> etapa única.....	48
3.9.3. RT-qPCR sistema <i>TaqMan<sup>®</sup></i> duas etapas .....	49
3.9.3.1. Síntese da cadeia de DNA complementar .....	49
3.9.3.2. Reações.....	50
3.10. Correlação entre PFU/mL e cópias/mL.....	51
3.11. Análise estatística .....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
4.1. Curva padrão .....	53
4.2. Otimização das concentrações dos oligonucleotídeos.....	57
4.2.1. <i>TaqMan<sup>®</sup></i> .....	57



4.2.2 <i>SYBR</i> <sup>®</sup> <i>Green</i> etapa única.....	59
4.3. Comparação entre ensaios de duas etapas com sistema <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> e o vírus FA17D/DEN3 avaliando duas regiões diferentes.....	63
4.4. Comparação entre ensaios de etapa única utilizando <i>SYBR</i> <sup>®</sup> <i>Green</i> (região E/NS1) e em duas etapas utilizando <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> (região NS5).....	65
4.5. Comparação entre ensaios de etapa única utilizando <i>SYBR</i> <sup>®</sup> <i>Green</i> e <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> .....	66
4.6. Comparação entre os ensaios de titulação por formação de placas de lise (PFU/mL) e RT-qPCR (cópias/mL).....	68
4.8.1 Cinética viral em garrafa estacionária.....	68
4.8.2 Cinética viral em <i>cell factory</i> .....	69
4.9. Análise estatística.....	75
5. CONCLUSÕES.....	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA – Do inglês, *complementary desoxiribonucleic acid*, que quer dizer ácido desoxirribonucleico complementar.

C<sub>T</sub> – Do inglês, *Cycle threshold*, que é o ciclo em que a curva de amplificação de uma determinada amostra cruza a linha que representa o limiar de quantificação de um ensaio de PCR em tempo real.

DENV – Vírus do Dengue.

DEPAD – Departamento de Administração.

DIBIO – Diretoria de Bio-Manguinhos.

DNA – Do inglês, *desoxiribonucleic acid*, que quer dizer ácido desoxirribonucleico.

E – Proteína estrutural do Envelope.

EIE – Ensaio Imunoenzimático.

ER – Do inglês, *endoplasmatic reticulum*, que quer dizer retículo endoplasmático.

FA17D/DEN – vírus recombinantes quiméricos da linhagem vacinal 17D de Febre Amarela e Dengue.

FHD – Febre Hemorrágica do Dengue.

GEPRO – Assessoria de Gerência de Projetos.

GPVIR – Gerência do Programa de Vacinas Virais.

IDAMS – Do inglês, *International Research Consortium on Dengue Risk Assessment Management and Surveillance*, que quer dizer Consórcio Internacional de Pesquisa em Gestão de Avaliação de Risco Dengue e Vigilância.

IFN – Interferon.

LATEV – Laboratório de Tecnologia Viroológica.

MGB – Do inglês, *Minor Groove Binder*, que quer dizer ligador de região menor.

NFQ – Do inglês, *Nonfluorescent Quencher*, que quer dizer supressor não fluorescente.

NS (1, 2, 3, 4a, 4b, 5) – Do inglês, *non-structural*, que quer dizer não estrutural, que quer dizer proteínas não-estruturais.

ORF – Do inglês, *open reading frame*, que quer dizer fase aberta de leitura.

PCR-qRT – Do inglês, *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*, que quer dizer transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa.

PFU – Do inglês, *plaque forming unit*, que quer dizer unidade formadora de placa.

prM – Proteína estrutural pré-membrana dos flavivírus.

PVIR - Programa de Vacinas Virais.

RNA – Do inglês, *ribonucleic acid*, que quer dizer ácido ribonucleico.

SCD – Síndrome de Choque por Dengue.

T<sub>H</sub>2 – Resposta imune de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 2.

TNF – Do inglês, *tumor necrosis factor*, que quer dizer fator de necrose tumoral.

UFP – Unidades Formadoras de Placas.

USA – Do inglês, *United States of America*, que quer dizer Estados Unidos da América.

VP-SFM – Do inglês, *Virus Production Serum Free Media*, que quer dizer Meio Sem Soro para Produção Viral.

WHO – World Health Organization, que quer dizer Organização Mundial de Saúde.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-1.</b> Imagem mostrando as partículas de DENV imaturo e maduro.....	2
<b>Figura 1-2.</b> Esquema das proteínas codificadas pelo vírus do Dengue. ....	3
<b>Figura 1-3.</b> Esquema mostrando a estrutura icosaédrica do vírus e a localização das proteínas estruturais nas formas virais madura e imatura.. ....	4
<b>Figura 1-4.</b> Ciclo de replicação dos flavivírus. ....	6
<b>Figura 1-5.</b> Ciclo de vida do vírus da Dengue.....	9
<b>Figura 1-6.</b> Antiga e nova classificação dos casos de Dengue.....	10
<b>Figura 1-7.</b> Estado da infecção mundial pelo DENV, em 2013. ....	12
<b>Figura 1-8.</b> Distribuição dos sorotipos do DENV em 1970 e 2004 .....	13
<b>Figura 1-9.</b> Gráfico comparativo o número de casos de Dengue no Brasil e nas Américas. ....	16
<b>Figura 1-10.</b> Variação do título de IgM e IgG nas respostas às infecções primária e secundária pelo vírus da dengue e os métodos diagnósticos que podem ser usados em cada etapa. ....	20
<b>Figura 1-11.</b> Comparação de testes diagnósticos. ....	20
<b>Figura 1-12.</b> Esquema da construção dos vírus quiméricos de Febre Amarela e Dengue sintetizados e utilizados no projeto de vacina recombinante tetravalente contra Dengue do PVIR/VDTEC – Bio-Manguinhos. ....	29
<b>Figura 1-13.</b> Fases e curvas de resposta do PCR em tempo real.....	31
<b>Figura 1-14.</b> Sete curvas de resposta do PCR em tempo real com diferentes concentrações de DNA inicial, desde 1 pg a 1 µg. ....	32
<b>Figura 1-15.</b> Curva Padrão obtida por diferentes amostras de concentrações conhecidas de DNA (a,b,c,d,e). Numa escala logarítmica os CT correspondem ao número inicial de moléculas .....	32
<b>Figura 1-16.</b> Tipos de sonda para PCR em tempo real.....	35
<b>Figura 1-17.</b> Esquema comparativo das reações de qPCR com os sistemas <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> e <i>SYBR</i> <sup>®</sup> <i>Green</i> . ....	38
<b>Figura 1-18.</b> Espectro com exemplos de alguns dos fluoróforos mais utilizados na técnica de qPCR e seus respectivos comprimentos de ondas .....	38
<b>Figura 3-1.</b> Cell factory de 10 andares. ....	42
<b>Figura 3-2.</b> Esquema da posição dos iniciadores utilizados no projeto.....	44
<b>Figura 4-1.</b> Curva padrão plasmidial da região NS5 (YFV) .....	54
<b>Figura 4-2.</b> Curvas padrão de RNA dos sorotipos FA17D/DEN1 e FA17D/DEN2 .....	55
<b>Figura 4-3.</b> Curvas padrão de RNA dos sorotipos FA17D/DEN3 e FA17D/DEN4. ....	56
<b>Figura 4-4.</b> Variação da concentração dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de TaqMan <sup>®</sup> em duas etapas. Valores encontrados para uma mesma amostra de estoque viral FA17D/DEN3 e seus respectivos desvios padrão. ....	57
<b>Figura 4-5.</b> Variação da concentração da sonda utilizada nas reações de TaqMan <sup>®</sup> em duas etapas. Valores encontrados para uma mesma amostra de estoque viral FA17D/DEN3 e seus respectivos desvios padrão. ....	58
<b>Figura 4-6.</b> Variação das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores, valores de C <sub>T</sub> encontrados para a mesma concentração de vírus (10 <sup>4</sup> cópias/ mL) e seus respectivos desvios padrão .....	59
<b>Figura 4-7.</b> Variação da concentração da sonda, valores de CT encontrados para a mesma concentração de vírus (10 <sup>4</sup> cópias/ mL) e seus respectivos desvios padrão .....	59
<b>Figura 4-8.</b> Variação das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores, valores de C <sub>T</sub> encontrados para a mesma concentração de vírus (10 <sup>7</sup> cópias/ mL) para os sorotipos de vírus quiméricos FA17D/DEN1 e FA17D/DEN2. ....	60

<b>Figura 4-9.</b> Variação das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores, valores de CT encontrados para a mesma concentração de vírus (107 cópias/ mL) para os sorotipos de vírus quiméricos FA17D/DEN3 e FA17D/DEN4. ....	61
<b>Figura 4-10.</b> Comparação entre CTs observados através da amplificação dos pontos de uma curva padrão de cDNA FA17D/DEN3 por duas regiões diferentes do vírus – E/NS1 e NS5 – utilizando o sistema TaqMan® em reações de duas etapas. ....	63
<b>Figura 4-11.</b> Comparação entre as médias dos CTs observados através da amplificação dos pontos de uma curva padrão de cDNA FA17D/DEN3 por duas regiões diferentes do vírus – E/NS1 e NS5 – utilizando o sistema TaqMan® em reações de duas etapas. ....	64
<b>Figura 4-12.</b> Comparação entre as médias dos CTs observados através da amplificação de um grupo de amostras utilizando o sistema TaqMan® em reações de duas etapas e o SYBR Green®. ....	66
<b>Figura 4-13.</b> Comparação entre CTs observados através da amplificação de pontos de cinéticas virais dos 4 sorotipos por SYBR Green® e TaqMan® em etapa única. ....	67
<b>Figura 4-14.</b> Comparação entre as médias dos CTs observados através da amplificação de pontos de cinéticas virais dos 4 sorotipos por SYBR Green® e TaqMan® em etapa única. ....	67
<b>Figura 4-15.</b> Perfil da cinética viral das quimeras dos quatro sorotipos em propagação realizada em garrafas estacionárias ventiladas de 175cm <sup>2</sup> , em meio VP-SFM. ....	69
<b>Figura 4-16.</b> Comparação entre o log <sub>10</sub> do número de cópias/mL, quantificado por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinado pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN1 em cell factory de 2 andares. ....	70
<b>Figura 4-17.</b> Comparação entre o log <sub>10</sub> do número de cópias/mL, quantificado por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinado pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN2 em cell factory de 2 andares. ....	71
<b>Figura 4-18.</b> Comparação entre o log <sub>10</sub> do número de cópias/mL, quantificado por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinado pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN3 em cell factory de 2 andares. ....	72
<b>Figura 4-19.</b> Comparação entre o log <sub>10</sub> do número de cópias/mL, quantificado por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinado pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN4 em cell factory de 2 andares. ....	73
<b>Figura 4-20.</b> Comparação entre o CT observado em quantificação por SYBR Green® em etapa única do ponto coletado no 5º dpi nas diferentes apresentações de cell factories com os quatro sorotipos de quimera. ....	75
<b>Figura 4-21.</b> Correlação entre os CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN1 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise. ....	77
<b>Figura 4-22.</b> Comparação entre as médias CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN1 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise. ....	77
<b>Figura 4-23.</b> Correlação entre os CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN2 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise. ....	78
<b>Figura 4-24.</b> Comparação entre as médias CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN2 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise. ....	78
<b>Figura 4-25.</b> Correlação entre os CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN3 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise. ....	79

<b>Figura 4-26.</b> Comparação entre as médias CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN3 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.....	79
<b>Figura 4-27.</b> Correlação entre os CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN4 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.....	80
<b>Figura 4-28.</b> Comparação entre as médias CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN4 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-1.</b> Vacinas candidatas para Dengue.....	24
<b>Tabela 1-2.</b> Vírus recombinantes e o processo pelo qual foram formadas.....	28
<b>Tabela 3-1.</b> Lista das cepas virais utilizadas ao longo do projeto e o título viral das amostras utilizadas.....	41
<b>Tabela 3-2.</b> Lista dos iniciadores e sondas para a região E/NS1, publicados em Mantel et al, 2008.....	44
<b>Tabela 3-3.</b> Lista dos iniciadores e sonda para a região NS5 de Febre Amarela publicados em Mantel et al, 2008.....	44
<b>Tabela 3-4.</b> Lista dos iniciadores desenhados para a região E/NS1.....	45
<b>Tabela 3-5.</b> Esquema com a variação da concentração dos iniciadores em nanoMolar (nM).....	46
<b>Tabela 3-6.</b> Condições da mistura dos reagentes para o ensaio de otimização da concentração da sonda <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> para as reações em duas etapas, utilizando o <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Universal PCR Master Mix</i> ( <i>Applied Biosystems</i> <sup>TM</sup> ).....	47
<b>Tabela 3-7.</b> Condições de mistura de reagentes para realização do ensaio de RT-qPCR usando o sistema <i>SYBR</i> <sup>®</sup> <i>Green</i> .....	47
<b>Tabela 3-8.</b> Concentração dos reagentes do ensaio usando o sistema <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> etapa única de RT-qPCR utilizando o <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Fast Virus 1-Step Master Mix</i> , da <i>Applied Biosystems</i> <sup>TM</sup> .....	48
<b>Tabela 3-9.</b> Condições de ciclagem térmica do ensaio usando o sistema <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> etapa única de RT-qPCR, utilizando o <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Fast Virus 1-Step Master Mix</i> , da <i>Applied Biosystems</i> <sup>TM</sup> .....	48
<b>Tabela 3-10.</b> Concentração dos reagentes do ensaio usando o sistema <i>SYBR</i> <sup>®</sup> <i>Green</i> de RT-qPCR.....	49
<b>Tabela 3-11.</b> Condições de ciclagem térmica do ensaio usando o sistema <i>SYBR</i> <sup>®</sup> <i>Green</i> de RT-qPCR.....	49
<b>Tabela 3-12.</b> Condições para a reação de síntese de cDNA.....	50
<b>Tabela 4-1.</b> Determinação dos limites de quantificação (LQ) das reações com o sorotipo <i>SYBR</i> <sup>®</sup> <i>Green</i> , T <sub>m</sub> e C <sub>T</sub> médio para os 4 sorotipos de quimeras, comparando com o observado nas reações em duas etapas com <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> .....	62
<b>Tabela 4-2.</b> Relação dos resultados obtidos, em log <sub>10</sub> , do número de cópias/mL, determinada pela quantificação por RT-qPCR <i>SYBR Green</i> <sup>®</sup> (etapa única), e de PFU/mL, determinada pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN1 em <i>cell factory</i> de 2 andares.....	70
<b>Tabela 4-3.</b> Relação dos resultados obtidos, em log <sub>10</sub> , do número de cópias/mL, determinada pela quantificação por RT-qPCR <i>SYBR Green</i> <sup>®</sup> (etapa única), e de PFU/mL, determinada pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN2 em <i>cell factory</i> de 2 andares.....	71
<b>Tabela 4-4.</b> Relação dos resultados obtidos, em log <sub>10</sub> , do número de cópias/mL, determinada pela quantificação por RT-qPCR <i>SYBR Green</i> <sup>®</sup> (etapa única), e de PFU/mL, determinada pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN3 em <i>cell factory</i> de 2 andares.....	72
<b>Tabela 4-5.</b> Relação dos resultados obtidos, em log <sub>10</sub> , do número de cópias/mL, determinada pela quantificação por RT-qPCR <i>SYBR Green</i> <sup>®</sup> (etapa única), e de PFU/mL, determinada pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN4 em <i>cell factory</i> de 2 andares.....	73

## RESUMO

A dengue é hoje uma das mais importantes doenças infecciosas do mundo em termos de morbidade e mortalidade. A doença é endêmica em mais de 60 países e estima-se que o vírus dengue (DENV) cause anualmente de 50-100 milhões de casos de doença febril aguda, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Para prevenção da dengue, atualmente só existe o combate ao vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, portanto, é de extrema importância que se desenvolva uma vacina eficaz contra esta doença. A grande dificuldade no desenvolvimento desta vacina está relacionada ao fato do DENV possuir quatro sorotipos (DENV-1, 2, 3 e 4), e uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo pode elevar as chances de agravamento do quadro clínico do paciente. Por este motivo, a vacina deve ser tetravalente e igualmente eficaz na proteção contra os quatro sorotipos. Com este objetivo, uma vacina recombinante tetravalente contra a dengue está em desenvolvimento em Bio-Manguinhos. Para o desenvolvimento e produção de vacinas virais em geral, é necessário que se faça o monitoramento da carga viral ao longo de todo o processo, desde a produção do antígeno, purificação, inativação, liofilização, testes pré-clínicos e clínicos e, após o licenciamento do produto, o processo de farmacovigilância contínuo. Atualmente, o padrão ouro para o monitoramento da carga viral realizado em Bio-Manguinhos é o ensaio de titulação por placa de lise, que leva de sete a dez dias para se obter o resultado. A padronização da técnica de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) permitirá que este monitoramento seja realizado em poucas horas. Desta forma, o nosso objetivo foi desenvolver um protocolo de RT-qPCR que permitisse quantificar com maior rapidez e eficácia os vírus quiméricos candidatos à vacina contra dengue, em todas as etapas que necessitem do monitoramento da carga viral durante o processo de desenvolvimento e produção da vacina. Embora a metodologia utilizada não seja capaz de identificar a capacidade infecciosa das partículas virais, foi possível estabelecer um fator de correção entre número de cópias do genoma com partículas infecciosas.



## ABSTRACT

Dengue is today one of the most important infectious diseases in the world in terms of morbidity and mortality. The disease is endemic in more than 60 countries and it's estimated that dengue virus (DENV) causes annually around 50-100 millions of acute fever cases, mainly in the tropical and subtropical regions of the world. Currently the only way to prevent Dengue, is to combat the mosquito vector *Aedes aegypti*. Therefore, it's extremely important to develop an effective vaccine against this disease. The main difficulty in the development of the vaccine is related to the fact that the Dengue virus has four different serotypes (DENV-1, 2, 3 e 4), and a secondary infection by a heterologous serotype may increase the chances of worsening the patient's condition. On this ground, the vaccine should be tetravalent and equally effective in protecting against all four serotypes. To this end, a tetravalent recombinant vaccine against dengue is under development in Bio-Manguinhos. The development and the production of viral vaccines needs the monitoring of the viral load in different stages, from the antigen production, purification, inactivation, lyophilization, preclinical and clinical trials and, after the product is licensed a continued pharmacovigilance is required. Currently the golden standard method to monitor the viral load in Bio-Manguinhos is the plaque assay, which takes about seven to ten days to get the results. The standardization of the real-time RT-PCR (RT-qPCR), will allow that this monitoring is carried out in a few hours. In this context, we developed a protocol of RT-qPCR which enables to quantify faster and effectiveness the chimeric viruses candidates to the vaccine against dengue, throughout all the steps listed above. Despite the fact that the used methodology isn't capable of identifying the infectious capability of the virus particles, it was possible to establish a correction factor between the number of genome copies with the infectious particles.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O DENV

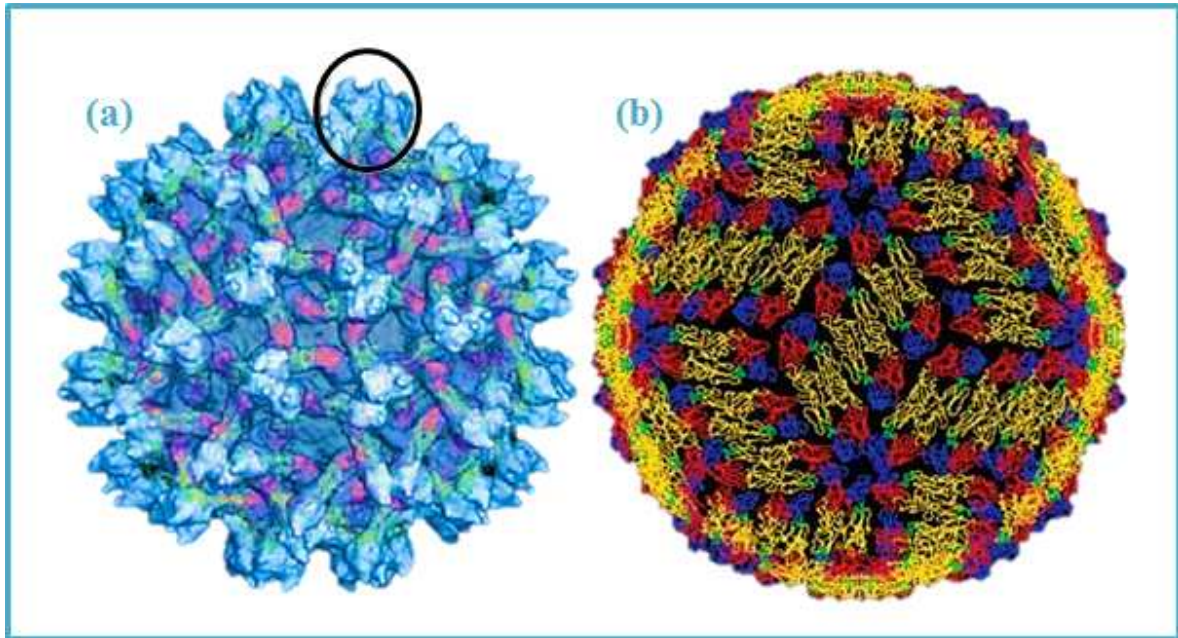
A Dengue é uma doença infecciosa aguda causada pelo vírus dengue (DENV), pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, representado por quatro sorotipos antigênicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (Calisher, 1989). Os DENVs são mantidos na natureza por um ciclo de transmissão que envolve hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, sendo o homem o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção. No continente americano, o vetor transmissor é o mosquito *Aedes aegypti* (Henchal e Putnan, 1990; Gúzman, 2005; Wearing e Rohani, 2006; Chaturvide e Nagar, 2008; Nagao e Koelle, 2008).

O gênero *Flavivirus* possui mais de 70 vírus, dos quais 40 são patogênicos ao homem (Qi et al, 2008; Bollati et al., 2010). Sendo os DENVs responsáveis pelas maiores taxas de doença e mortalidade dentre todos os membros desse gênero (Mukhopadhyay et al, 2005).

O material genético do DENV é constituído por RNA de fita simples positiva (ssRNA+) de 10,7 kb, que tem uma única fase aberta de leitura (do inglês, *open reading frame* – ORF), ou região codificante, que é traduzida em uma poliproteína, de 3.386 aminoácidos, que é processada durante e após a transcrição por proteases celulares e virais (Zhang et al, 1988; Fauquet et al, 2005).

A poliproteína é clivada em três proteínas estruturais: do capsídeo (C), da pré-membrana (prM) e do envelope (E), além das sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Hahn, 1988; Lindenbach et al, 2001) (Figura 1-1). A translocação da poliproteína na membrana do retículo endoplasmático é direcionada por sequências sinais e são seguidas da clivagem desta poliproteína por proteinases do vírus e da célula (Zhang et al, 2003). No N terminal da poliproteína está a proteína capsídica (C), seguida da pré-membrana (prM) e da glicoproteína do envelope (E) (Figura 1-2). Durante o tráfego pela via secretora, a proteína prM é

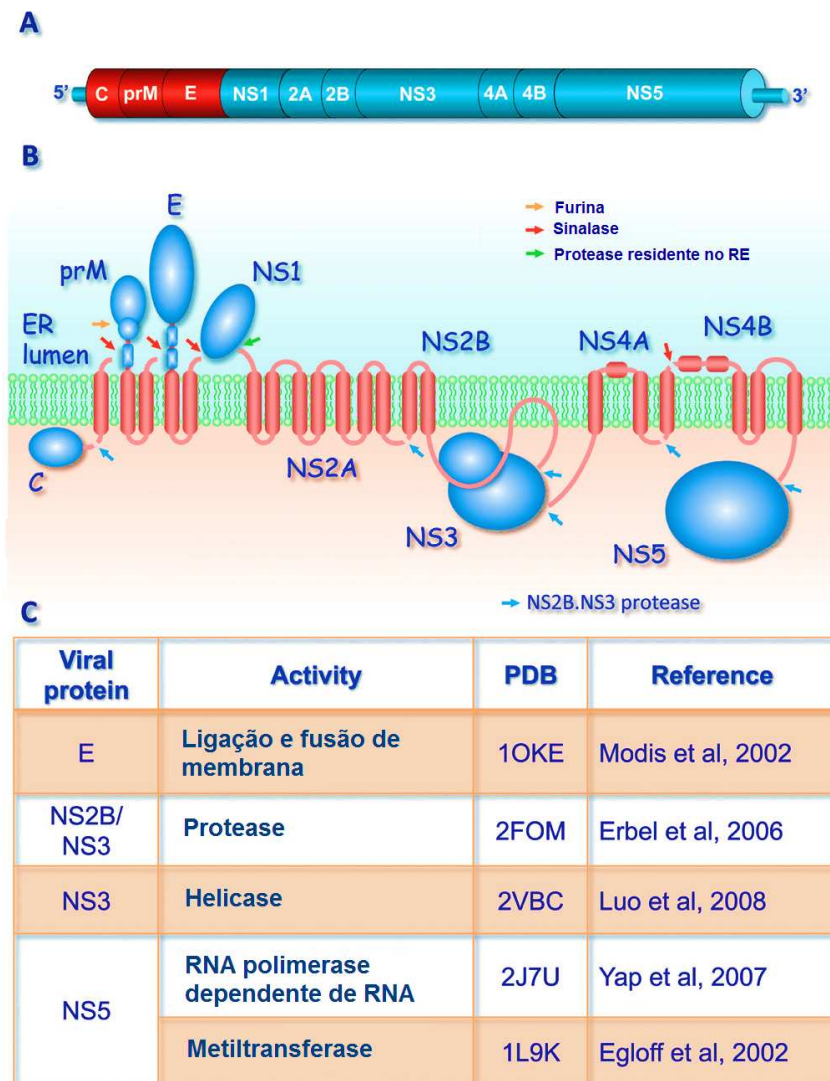
clivada pela protease celular furina (Elshuber et al, 2003), liberando 91 aminoácidos do N-terminal e deixando 180 cópias da proteína M resíduo 75 com 180 proteínas E ancoradas à membrana do vírus. Este processo caracteriza a maturação da partícula viral (Rice et al, 1985; Op de Beeck et al, 2003).



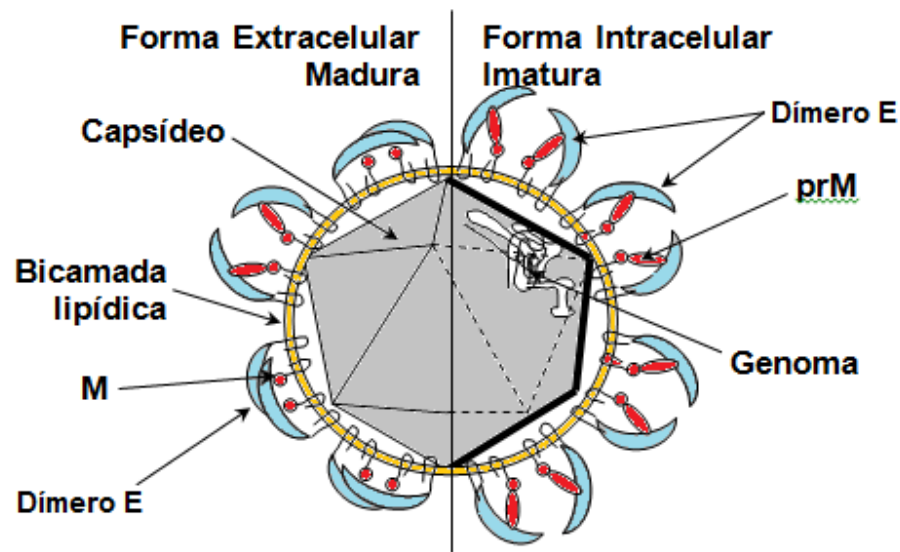
**Figura 1-1.** Imagem mostrando as partículas de DENV imaturo e maduro. (a) A partícula de Dengue imatura. Ela tem 60 espículas proteicas (circuladas) que se projetam a partir da sua superfície, o que a torna menos uniforme que a forma madura. (b) Estrutura do DENV maduro. A superfície do vírus é lisa e sua membrana é totalmente fechada por uma concha de proteína. A proteína E se organiza em três dímeros paralelos de proteína, seus diferentes domínios estão representados por diferentes cores (domínios I, II e III estão coloridos em vermelho, amarelo e azul, respectivamente) e o peptídeo de fusão aparece em verde. Extraído e adaptado de: Qi e Zhang, 2008.

As proteínas estruturais são responsáveis pela formação da estrutura externa da partícula viral. A proteína prM é o precursor da proteína da membrana (M), a proteína E dá origem ao envelope e a proteína C forma o capsídeo viral (Rice et al, 1985) (Figura 1-3). A proteína E é responsável pela ligação a receptores celulares, fusão de membrana dependente de pH e possui importante função indutora de resposta imune. Ao serem sintetizadas, as proteínas E e prM se associam formando heterodímeros que brotam para o lúmen do retículo endoplasmático (ER) e são incorporados aos vírions imaturos. Os heterodímeros formam uma rede de interações, criando uma estrutura icosaédrica, que provavelmente gera a força motriz, levando ao brotamento. As partículas são transportadas através de vias secretórias e, pouco antes de serem liberadas, são convertidas em uma forma ativa através da clivagem da prM pela furina. As interações entre os heterodímeros prM e E são importantes para o enovelamento correto da

proteína E e provavelmente também para a proteção do vírion imaturo contra a inativação ácida durante o transporte através das vesículas ácidas (Op De Beeck et al, 2003). O organismo humano responde a estas proteínas durante uma infecção, com a produção dos anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) contra as glicoproteínas do envelope e neutralizantes (N) contra a proteína C do capsídeo (Chambers et al, 1990).



**Figura 1-2.** Esquema das proteínas codificadas pelo vírus do Dengue. (A) Genoma dos flavivírus. (B) A poliproteína dos flavivírus é expressa em associação com o retículo endoplasmático e co e pós-traducionalmente clivada por proteases virais e do hospedeiro. (C) Atividades funcionais e estrutura das proteínas do vírus do Dengue. Extraído e adaptado de: Young, 2010.



**Figura 1-3.** Esquema mostrando a estrutura icosaédrica do vírus e a localização das proteínas estruturais nas formas virais madura e imatura. Extraído e adaptado de: Gardner e Ryman, 2010.

As proteínas não estruturais são responsáveis pelas atividades de expressão e reguladoras do vírus, incluindo replicação, virulência e patogenicidade. Elas são proteínas grandes e altamente conservadas: NS1, NS3 e NS5 e proteínas pequenas e hidrofóbicas NS2 e NS4 (Chambers et al, 1990).

A glicoproteína NS1 está associada à membrana, formando dímeros que ficam na membrana da célula em contato com o meio extracelular (Westaway et al, 1985). Está envolvida na maturação viral, participa da patogênese inibindo a ativação da cascata do sistema complemento e corresponde ao antígeno fixador de complemento, participando da indução de anticorpos específicos usando receptor Fc via mecanismos dependentes e independentes. Tem importância na replicação da fita negativa de RNA (Lindenbach et al, 1999).

A proteína NS3 possui três atividades enzimáticas distintas: de protease, sendo responsável pelo processamento proteolítico da poliproteína viral em sítios que a protease celular não atua (Chambers et al., 1990b; Falgout et al., 1991; Yamshchikov & Compans, 1995; Yamshchikov & Trent 1997; Stocks & Lobigs, 1998), de helicase e de nucleotídeo-trifosfatase. As duas últimas conferem a esta proteína papel importante também no processo de replicação do RNA viral. Assim como a NS1 a proteína NS3 também possui um papel imunológico importante, sendo alvo para células T citotóxicas (Tan et al., 1990; King et al., 2003).

As quatro pequenas proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B possuem uma sequência de aminoácidos pouco conservada, mas não no seu padrão de múltiplos trechos hidrofóbicos. Foram relacionadas, até o momento, a alguns processos da propagação viral. A NS2A está provavelmente associada à maturação de NS1, replicação viral e montagem da partícula (Kummerer & Rice, 2002; Leung et al, 2008). A NS2B é um possível componente da protease/replicase e atua na formação de componentes do capsídeo durante a replicação. A protease serina N-terminal (NS3) atua como um cofator essencial para a NS2b no processamento da poliproteína, enquanto a helicase/NTPase C-terminal atua na separação da fita simples de RNA (dependente de ATP) durante replicação (Falgout et al., 1991; Chambers et al, 1993; Jan et al., 1995; Yamshchikov e Compans, 1995). As proteínas NS4a e NS4b estão associadas à membrana do RE e são possíveis componentes da replicação viral e também possuem sequências codificantes pouco conservadas. A NS4A interage com NS1 permitindo a sua interação no processo citoplasmático da replicação do RNA (Lindenbach e Rice, 1999).

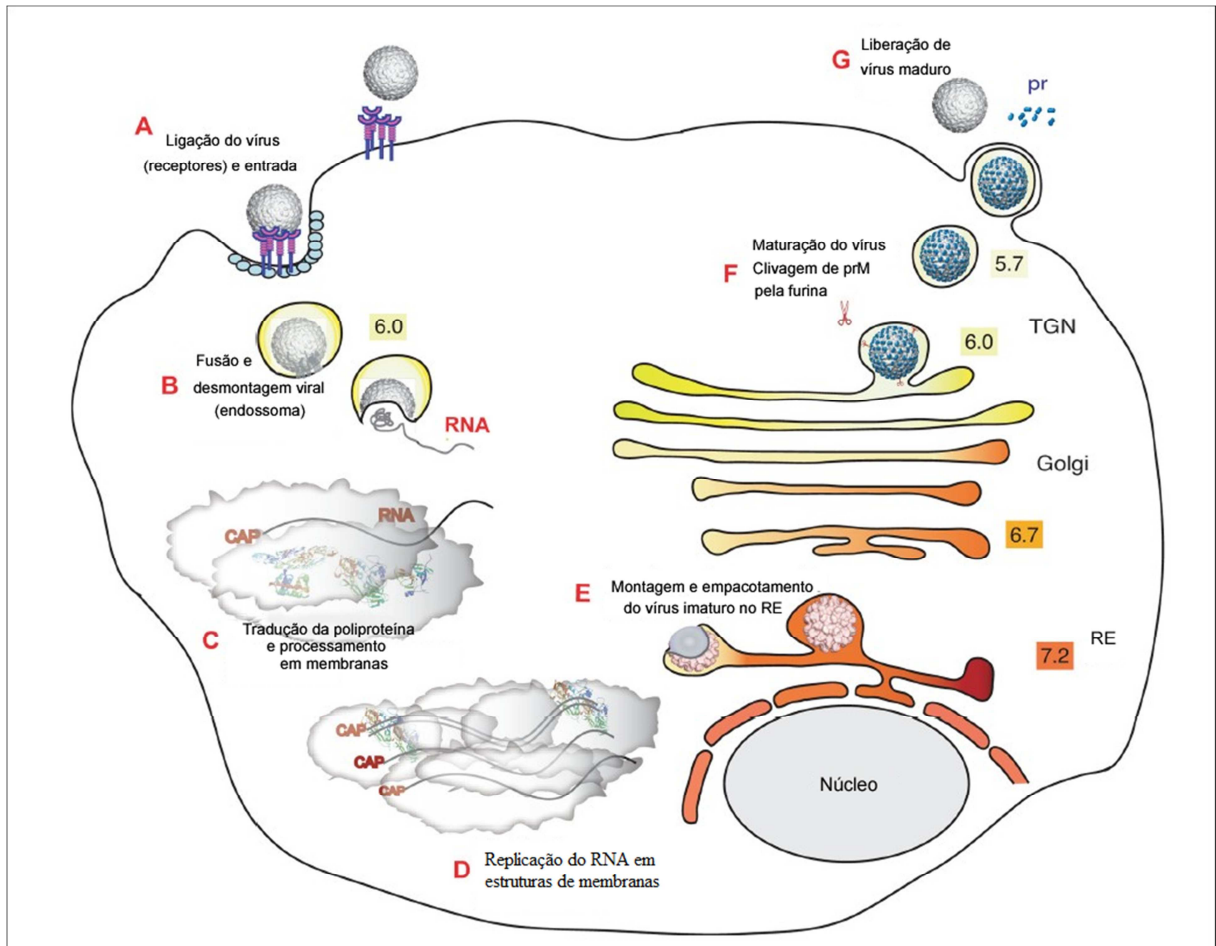
A proteína NS5, tem um peso molecular de 103 kDa, é a maior e mais conservada proteína dos flavivírus. Ela possui duas atividades separadas codificadas em domínios. Os 300 aminoácidos do N-terminal da NS5 representam o domínio metiltransferase, que metila a estrutura cap (capeamento do RNA), e os 605 aminoácidos do C-terminal contém o domínio RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que tem um importante papel na amplificação do RNA viral (O'reilly & Kao, 1998; Qi et al, 2008; revisado por Davidson, 2009).

A replicação (Figura 1-4) do RNA acontece na membrana do ER, associada ao complexo de replicação que compreende ambas as proteínas, viral e celular. Os dois maiores componentes desse complexo são as proteínas NS3 e NS5, que fornecem propriedades enzimáticas vitais para a replicação do RNA (Figura 1-4). Durante a replicação, os vírus também recrutam fatores celulares que são componentes normais no processamento ou tradução do RNA celular. Nos últimos anos, foi reportado que a proteína NS5 interage com várias proteínas do hospedeiro para a replicação viral, como fatores celulares relacionados com vias do interferon, proliferação celular, regulação da transcrição, permeabilidade celular e transporte vesicular, sugerindo que a NS5 provavelmente está envolvida na patogênese viral (Ashour et al, 2009; Ellencrona et al, 2009; Linet al, 2006; Mazzonet al, 2009; Werme et al, 2008; Bronzoni et al, 2011).

Diferente da DNA polimerase e muitas RNA polimerases, a RNA polimerase da família *Flaviviridae* inicia a síntese de RNA *in vivo* através de um mecanismo *de novo*, no qual um



segundo NTP é adicionado diretamente ao primeiro NTP 3'-OH (com a liberação de sua porção pirofosfato), sem a necessidade de um iniciador (Choi e Rossmann, 2009).



**Figura 1-4.** Ciclo de replicação dos flavivírus. A) Interação do vírion com a superfície celular por meio de receptores, seguido de endocitose. B) A acidificação do endossoma promove a mudança conformacional da proteína E que ocasiona na exposição do peptídeo de fusão levando à fusão das membranas do endossoma e do envelope viral, liberando o RNA viral no citoplasma. C) O RNA viral é traduzido nas membranas do RE e a poliproteína é traduzida e processada por enzimas celulares e virais. D) As fitas de RNA viral polaridade + são replicadas em estruturas originadas por membranas celulares. E) Montagem de partículas virais imaturas, que adquirem o envelope por brotamento nas membranas do RE. F) Transporte da partícula viral imatura pelas membranas do Golgi e clivagem de prM pela protease furina nas cisternas do Trans-Golgi (TGN). Liberação da partícula madura por exocitose para o meio extracelular. Os quadrados em tons de laranja indicam o pH dos compartimentos celulares. Extraído de adaptado de: Perera et al, 2008.

### 1.1.1. Sorotipos e genótipos do DENV

Vários estudos têm revelado que cada sorotipo do DENV é composto de grupamentos (clusters) filogeneticamente distintos, os quais têm sido classificados em “genótipos” ou “subtipos”. Cada genótipo é composto de “grupos” ou “clades” também filogeneticamente distintos (Lindenbach et al, 2007; Gould e Solomon, 2008; Qi et al, 2008).

Com base em testes de neutralização, os DENV são classificados em quatro sorotipos imunologicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Em cada sorotipo existem vírus com genótipos diferentes. Embora epidemiologicamente semelhantes, os quatro sorotipos são geneticamente e antigenicamente distintos. A infecção com um sorotipo leva a proteção permanente contra uma reinfecção homóloga e apenas parcial contra uma infecção heteróloga (Wang et al, 2000; Wikramaratna et al, 2010).

Análises filogenéticas com base na sequência de 240 nucleotídeos correspondentes à região de junção das proteínas E e NS1 de diferentes cepas de DENV-1 e DENV-2, têm indicado a existência de cinco genótipos para cada um destes sorotipos (Rico-Hesse, 2007).

Para DENV-1 estes são: genótipo I, representado por cepas do Sudeste da Ásia, China e África Oriental; genótipo II com cepas de Taiwan e Tailândia; genótipo III da Malásia; genótipo IV representado por cepas da Austrália e a Oeste das ilhas do Pacífico; e genótipo V representado pelas cepas coletadas nas Américas, cepas da África ocidental e algumas cepas da Ásia (Rico-Hesse, 2007; Weaver e Vasilakis, 2009).

DENV-2 inclui cinco genótipos principais: Dois ramos de genótipo Asiático, o genótipo Asiático I (cepas da Malásia e Tailândia) e Asiático II (cepas do Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas); Genótipo Cosmopolita (cepas da Austrália, África oriental e ocidental, Ilhas do Pacífico e da Índia, e Índia continental); Genótipo americano (cepas da América latina, e cepas mais antigas identificadas no Caribe, ilhas do Pacífico e Índia); Genótipos do Oeste da Ásia/América (cepas da Tailândia do Vietnã e cepas isoladas nas Américas nos últimos 20 anos); Genótipo Silvestre do oeste da África e sudeste da Ásia (Rico-Hesse, 2007; Weaver e Vasilakis, 2009).

Vários estudos têm mostrado a existência de quatro genótipos de DENV-3: Genótipo I, Filipinas, Indonésia e Malásia; Genótipo II, Tailândia, Vietnã e Bangladesh; Genótipo III, Sri Lanka, Índia, África e Samoa; e genótipo IV, Porto Rico, Américas Latina e Central e Taiti. (Wang et al, 2000; Weaver e Vasilakis, 2009).

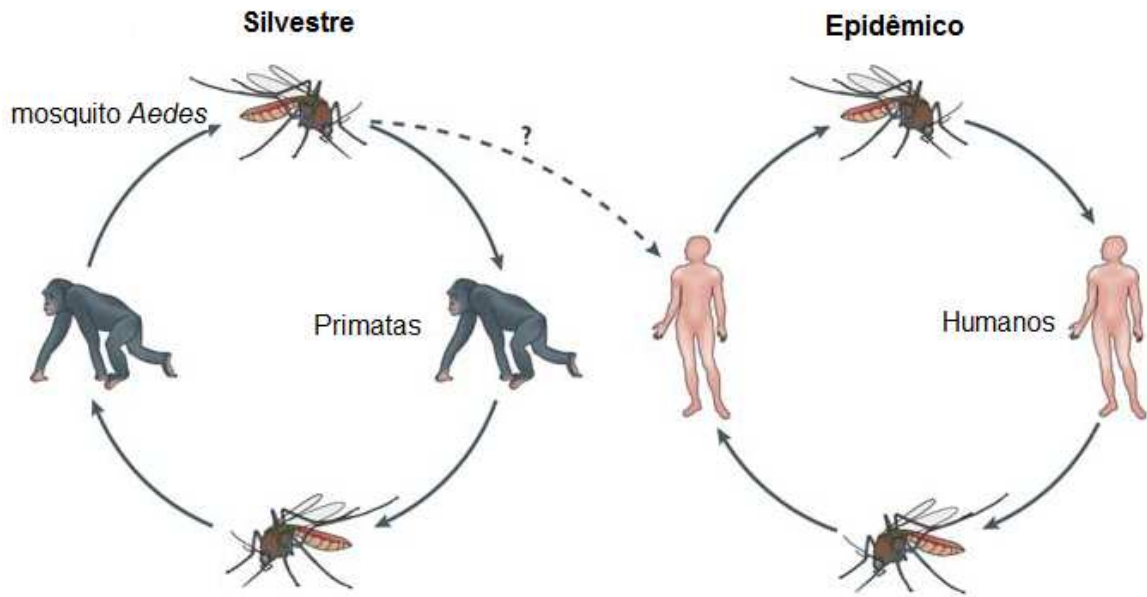
Os quatro genótipos correspondentes ao DENV-4 são: Genótipo I com cepas da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão; Genótipo II representado por cepas da Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas; Genótipo III com cepas da Tailândia (distintas das outras tailandesas); e genótipo IV com cepas silvestres da Malásia (Wang et al, 2000; Weaver e Vasilakis, 2009).



Esta classificação foi confirmada por outros estudos analisando a sequência completa do gene da proteína E e a região não codificante 3' (RNC3') (Wang et al, 2000). O papel das variações genéticas combinadas com a evolução epidemiológica viral, indicou que, genótipos específicos pertencentes a certos sorotipos estariam associados a maior ou menor severidade da doença causada pelo vírus do Dengue (Rico-Hesse, 2007). A variação genética entre genótipos pode ser responsável pelas diferenças na infecção celular, principalmente em macrófagos, sugerindo que certas cepas possuem mais virulência que outras e assim, apresentem uma alta taxa de replicação viral resultando em aumento da severidade da doença (Vaughn et al, 2000).

## 1.2. Ciclo de transmissão do vírus

Os DENVs são transmitidos, através da picada de um mosquito *Aedes aegypti* (*Aedes albopictus* ou *Aedes polynesiensis*, com menor frequência, em regiões da Ásia e da África) (Bancroft, 1906; Rosen et al, 1954; Halstead, 1998; Honório et al, 2003), de pessoa a pessoa, sendo os humanos os principais hospedeiros para a amplificação, ao contrário do que acontece com outros flavivírus. O ciclo tem início quando, após a ingestão de sangue pela fêmea (hematófaga) do *Ae. aegypti* contendo o vírus, obtido a partir de um hospedeiro vertebrado virêmico (fase de viremia 4-12 dias), ocorre uma infecção das células epiteliais do intestino do mosquito, que propaga-se através da lâmina basal do intestino para a circulação alcançando as glândulas salivares do mosquito vetor, após um período de 8 a 12 dias, no chamado período de incubação extrínseca (Figura 1-5). O mosquito irá permanecer infectante até o fim da vida (cerca de um mês) e poderá transmitir a infecção com  $10^2$  partículas virais (Tomashek e Margolis, 2011). O DENV replica também em humanos, no período conhecido como incubação intrínseca, que dura de 3 a 14 dias antes do aparecimento dos sintomas. As pessoas infectadas, por sua vez, podem transmitir DENV para os mosquitos de 1 a 2 dias antes do aparecimento dos sintomas (Nishiura e Halstead, 2007) e até cerca de 7 dias do período de viremia, podendo alcançar concentrações de até  $10^7$  cópias de RNA viral por mililitro de sangue, mesmo nas infecções assintomáticas (Mohammed et al, 2008; Linnen et al, 2008).



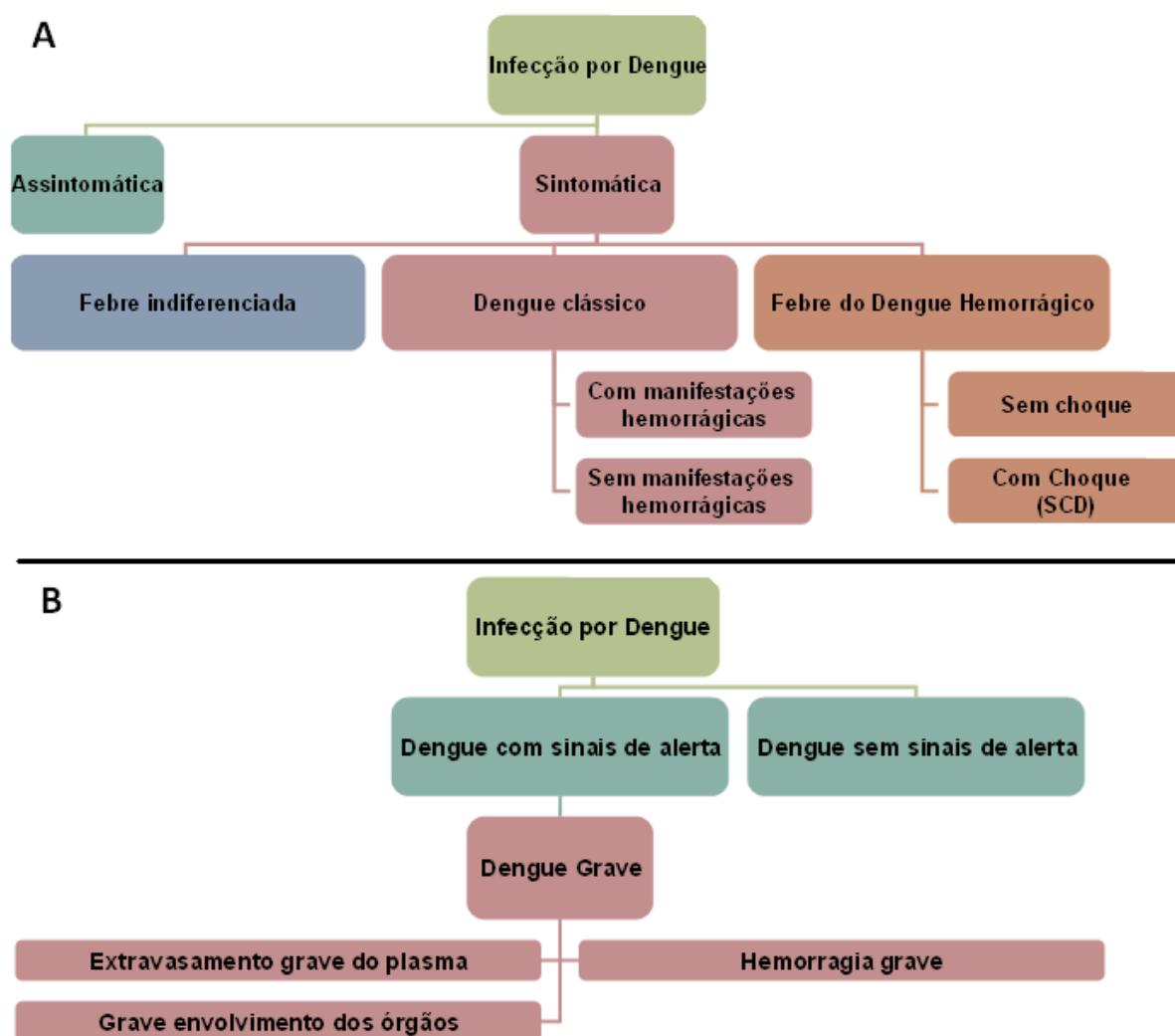
**Figura 1-5.** Ciclo de vida do vírus da Dengue. Fonte: Tomashek e Margolis, 2011.

Durante o período de viremia, que existe tanto em casos sintomáticos quanto assintomáticos, há indícios de que DENV possa ser transmitido por produtos do sangue, doação de órgãos ou tecidos, ou mesmo através de exposição ocupacional em instituições de saúde (Tambyah et al, 2008; Wilder-Smith et al, 2009).

### 1.3. Sintomatologia da Dengue

As infecções pelo DENV podem variar de assintomáticas ou um estado febril brando, a quadros mais graves que podem levar a morte, a Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) e a Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (Figura 1-6).

A forma clássica da Dengue é caracterizada por febre alta, dor de cabeça frontal ou retro-orbital, dor muscular, vômitos, dor nas articulações, fadiga severa e eritema maculopapular. Em suas formas mais graves, FHD e SCD, a doença inclui uma síndrome caracterizada por extravasamento de plasma, petéquias, hemoconcentração e derrame peritoneal e/ou pleural. Indivíduos que apresentem as formas mais graves da doença, quando não tratados adequadamente, podem chegar ao choque e à morte. (Sierra et al, 2007).



**Figura 1-6.** Antiga (A) e nova (B) classificação dos casos de Dengue. Fonte: WHO, 2009.

A incidência das formas mais graves é maior entre as infecções secundárias que ocorrem quando um indivíduo é infectado por um sorotipo heterólogo ao da infecção primária (Halstead e Deen, 2002; Premaratna, 2007; Tomashek e Harold, 2011). Diversas teorias são propostas para explicar o alto grau de variação das manifestações clínicas causadas pelos DENV. A teoria da infecção sequencial ou da facilitação dependente de anticorpos (do inglês: “*ADE - antibody dependent enhancement*”, considera que há um aumento da replicação viral em macrófagos via anticorpos heterólogos. Em infecções secundárias com o vírus de sorotipo diferente da infecção anterior, os anticorpos que reagem de forma cruzada com este novo sorotipo, sem neutralizá-los. Estes complexos, ao serem reconhecidos e internalizados por fagócitos mononucleares, resultariam na infecção celular e replicação viral. Essas células infectadas liberam na corrente

sanguínea mediadores vasoativos, aumentando a permeabilidade vascular, ativação do sistema complemento e da tromboplastina tissular (Hasteed, 1988)

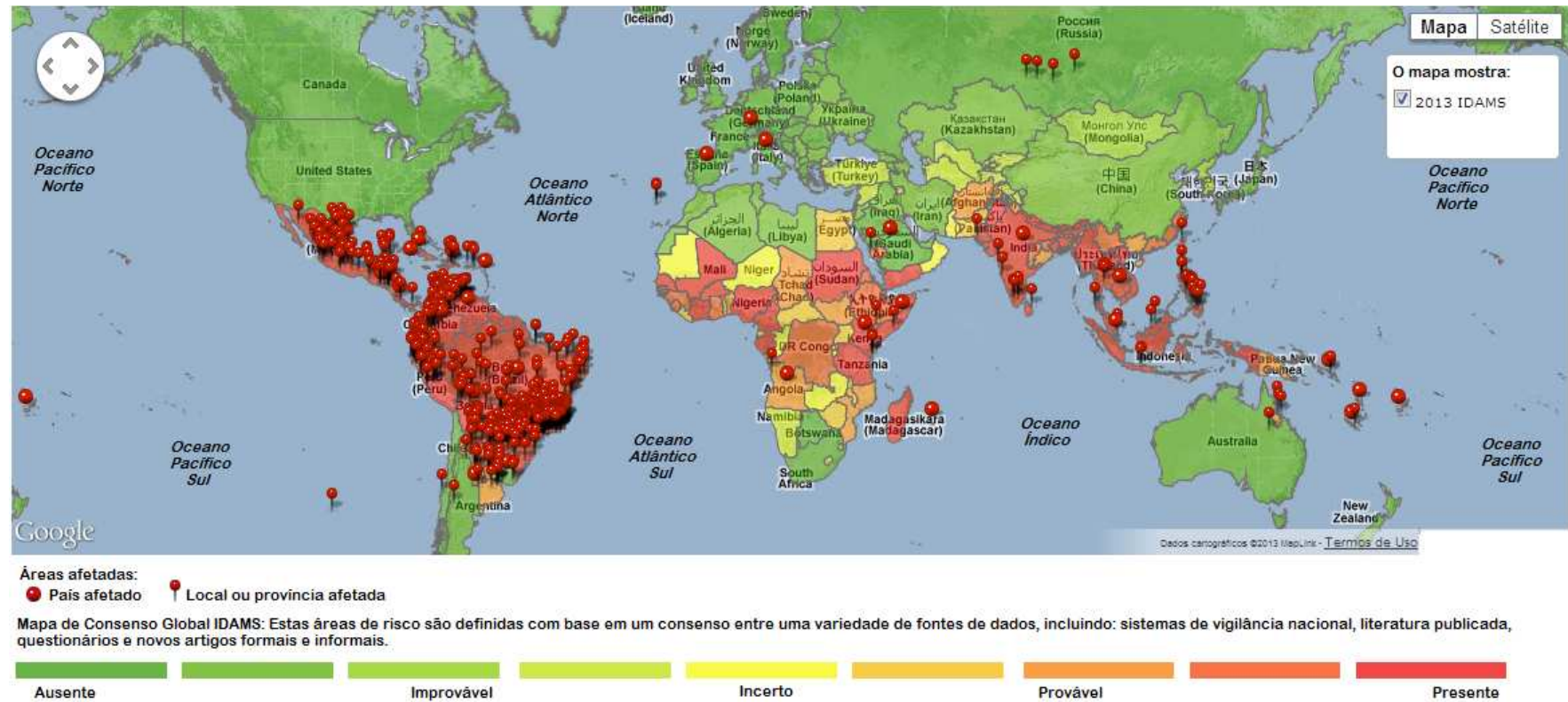
A teoria da virulência viral sugere que a gravidade da doença deve-se às variações genéticas e antigênicas das diferentes cepas de vírus. Uma explicação admitida é que a evolução genética do vírus dentro de cada sorotipo possa dar origem a cepas epidêmicas ou mais virulentas (Rosen et al, 1977; Rico-Hesse,1990).

No Brasil atualmente co-circulam os 4 sorotipos de DENV, o que favorece infecções sequenciais. Por este motivo é de extrema importância o desenvolvimento de uma vacina tetravalente, que proteja de forma eficaz e duradoura contra os quatro sorotipos de DENV, já que uma vacina contra somente um dos sorotipos poderia representar uma infecção primária, aumentando o risco de infecções secundárias entre os vacinados (Monath, 2007; Tomashek e Harold, 2011).

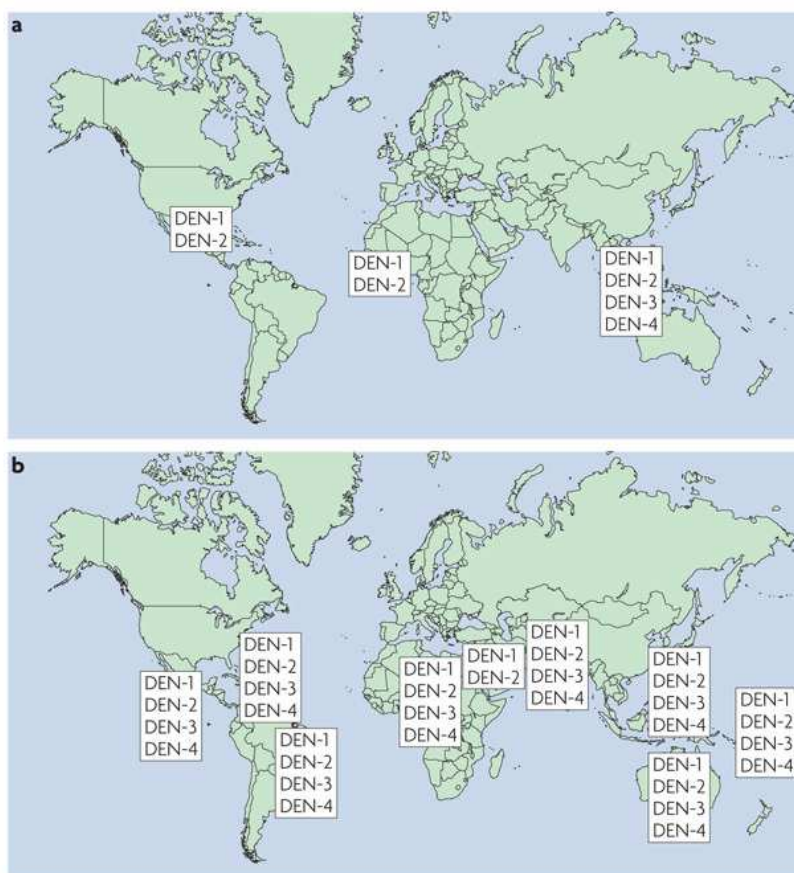
#### **1.4. Epidemiologia da Dengue**

Atualmente a dengue é a doença infecciosa transmitida por mosquito com maior frequência no mundo em termos de morbidade e mortalidade. A doença é endêmica em mais de 60 países e estima-se que os DENVs causem anualmente de 50-100 milhões de casos de doença febril aguda, sendo 500 mil casos hemorrágicos, 200 mil mortes e taxa de mortalidade variando entre 0,03% e 13,7%. Em 2006, este índice foi de 11% (Halstead, 2007; WHO, 2009; Costa et al, 2012) (Figura 1-7).

O número de países afetados pelo DENV vem aumentando muito e, além disso, os países que já eram afetados sofrem com a circulação de novos sorotipos, levando à ocorrência de surtos e aumento do número de mortes. Atualmente, a maior parte das regiões afetadas pelo DENV sofrem circulação dos quatro sorotipos do vírus (Guzmán, 2010) (Figura 1-8).



**Figura 1-7.** Estado da infecção mundial pelo DENV, em 2013, segundo dados coletados pelo IDAMS. As regiões do globo estão coloridas de acordo com sua atuação situação com relação a circulação do vírus e as regiões mais afetadas estão marcadas com os círculos vermelhos. Extraído e adaptado de: <http://www.healthmap.org/dengue/index.php>.



**Figura 1-8.** Distribuição dos sorotipos do DENV em 1970 (a) e 2004 (b).  
Extraído e adaptado de: Guzmán et al, 2010.

#### 1.4.1. Dengue nas Américas

Desde 1896 existem registros de epidemias de dengue no continente americano, ocorrendo em intervalos irregulares nos Estados Unidos (EUA) e em países do Caribe, mas o sorotipo não era conhecido. Em 1953, foram isoladas as primeiras amostras de DENV-2 em Trinidad, em 1963, em Porto Rico, foi isolado pela primeira vez o DENV-3 nas Américas (Gubler et al, 1997). Durante as décadas de 60 e 70, epidemias de dengue eram raras devido à erradicação do *Ae. aegypti*. Com a descontinuidade do programa de erradicação no início dos anos 70, re-infestação e disseminação do vetor foi inevitável, conforme mostra a figura 1.7 (Gubler et al, 1997; Anderson et al, 1956).

O DENV-1 foi introduzido na Jamaica, em 1977, causando uma Pandemia que se expandiu para todas as Ilhas do Caribe, países das Américas Central e Sul, causando epidemias

principalmente nas Guianas e Venezuela. No período de 1977 até 1980, foram notificados mais de 702.000 casos da doença, praticamente todos estes causados pelo DENV-1 (PAHO,1989).

Em 1981, o DENV-4, foi introduzido nas Ilhas do Caribe (Gubler et al, 1997), durante este ano ocorreu a primeira epidemia de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) em Cuba, com a introdução de uma nova variante do DENV-2, posteriormente classificado com o genótipo Asiático. Foram notificados cerca de 344.000 casos com aproximadamente 116.000 internações e 158 óbitos (Kouri et al, 1986; Gubler, 2006), 98-99% foram infecções do tipo secundária (Guzman et al, 2010).

No período de 1989, ocorreu na Venezuela a segunda maior epidemia de FHD/SCD (Síndrome do Choque por Dengue) das Américas, com cerca de 20 mil casos onde co-circularam os DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (Malavige et al, 2004).

No ano de 1994, o DENV-3 foi reintroduzido na Nicarágua e Panamá e, em 1995, no México (PAHO,1997). Esta variante de DENV-3 mostrou-se geneticamente distinta daquela que anteriormente circulava nas Américas (genótipo IV) e foi caracterizada como genótipo III (Lanciotti et al, 1994; Anonymus, 1995). Este genótipo foi associado à ocorrência de epidemias de FHD/SCD no Sri Lanka e Índia e casos de FHD no México e países da América Central (Gubler et al, 1997). Nos anos seguintes, o DENV-3 foi detectado em outros países do continente, chegando à América do Sul (Pinheiro e Corber,1997; Rigau-Perez et al, 2002).

Atualmente o Dengue apresenta surtos cíclicos que ocorrem a cada 3 a 5 anos, tendo o maior ocorrido em 2002, com mais de 1 milhão de casos reportados e uma taxa de mortalidade por Dengue hemorrágica de 1,2%. Os quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) circulam na região. (WHO, 2009).

É importante destacar que um surto de Dengue pode envolver de 70 a 80% da população, o que pode levar a perdas econômicas significativas (Keating, 2001). Outras perdas econômicas estão relacionadas a despesas hospitalares, uma vez que cerca de 500 mil pessoas com Dengue hemorrágica requerem hospitalização a cada ano. Além da população adulta, uma grande parte dos hospitalizados consiste de crianças, sendo, nestes casos, a taxa de mortalidade de 2,5%, envolvendo custos hospitalares adicionais. O impacto econômico provocado pelos surtos da dengue é semelhante ao causado por outras doenças como malária, meningite e hepatite. Além disso, com o aumento da urbanização nas áreas endêmicas e o aumento da área de transmissão existe um risco de que estes números sejam ainda maiores no futuro (Clark et al, 2005; Anderson

et al, 2007; Morens e Fauci, 2008; Suaya et al, 2009; Knowlton et al, 2009; Guzman e Istúriz, 2010).

Sugere-se que os quatro sorotipos tenham sido originados de quatro passagens zoonóticas para humanos independentes (Vasilakis et al, 2011). Todos os sorotipos parecem ter sido originados na Ásia, exceto DENV-3, que aparentemente surgiu na América. A prevalência dos quatro sorotipos do Dengue variou de forma distinta ao longo do tempo. Enquanto DENV-1 teve três períodos onde sua prevalência aumentou, no começo de 1970, 1980 e 2000, DENV-2 teve sua população aumentada no início da década de 1980 e 2000, DENV-3 teve um aumento abrupto no início da década de 2000 e DENV-4 foi o único que, após um período de expansão da população nos anos 1980, apresentou um momento de diminuição da população, em meados da década de 1990 (Costa et al, 2012).

#### **1.4.2 Dengue no Brasil**

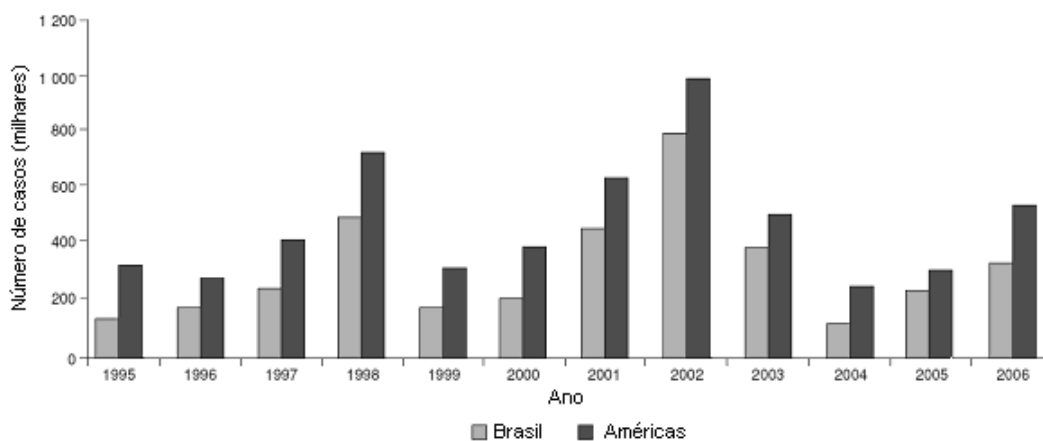
No Brasil, o primeiro relato não confirmado de Dengue, datado de 1923, foi registrado no estado do Rio de Janeiro, na cidade de Niterói (Veronesi, 1991). Durante os anos seguintes, esta doença não chegou a ser um problema grave de saúde pública. Isto está diretamente ligado ao importante feito, ocorrido na década de 30, a erradicação do *A. aegypti* das áreas urbanas, em ação realizada pelo órgão de saúde pública na época responsável pelo controle da Febre Amarela, que teve como consequência indireta o controle do Dengue (Martins e Castineiras, 2007). A origem da grande dimensão das epidemias de Dengue na atualidade, a ponto de se ter transformado em um problema de saúde pública nacional, tem a seguinte cronologia: o primeiro momento está relacionado com a grande atividade do DENV no continente americano, deflagrado pela reinfestação do Brasil pelo vetor *A. aegypti* em 1977, fato este que contribuiu para a reintrodução do vírus do Dengue no Brasil nos anos 80. Desde então, mais de 60% dos casos registrados de Dengue nas Américas ocorreram no Brasil (Figura 1-9).

Em seguida, ocorreu um surto de Dengue no período compreendido entre 1981 e 1982, causado pelos sorotipos 1 e 4, na cidade de Boa Vista (Roraima), próximo à fronteira com a Venezuela. Tal surto foi contido por medidas locais de controle de vetores e, durante os quatro anos seguintes, não houve registro de atividade dos vírus no Brasil (Nogueira et al, 2007).

Somente a partir de 1986 que o dengue se tornou um problema de Saúde Pública nacional, com a introdução do DENV-1 no município de Nova Iguaçu (RJ), (Schatzmayr et al, 1986),



alcançando um elevado número de notificações em vários estados do Brasil (Miagostovich et al, 1993; Nogueira et al, 1999; Figueiredo, 2000). Em 1990, um novo sorotipo, o DENV-2 foi isolado na cidade de Niterói (Nogueira et al, 1990). Esta nova situação epidemiológica resultou no agravamento do quadro clínico e a notificação dos primeiros casos de Dengue Hemorrágica (DH) e da Síndrome de Choque por Dengue (SCD) do país. Em dezembro de 2000 mais um sorotipo, o DENV-3, foi detectado no município de Nova Iguaçu, sendo responsável até aquele momento pela maior e mais grave epidemia de dengue já descrita no país e no continente americano, não apenas pelo elevado número de notificações (794.200 casos) como pela ocorrência de casos graves e fatais (Araújo et al, 2009).



**Figura 1-9.** Gráfico comparativo o número de casos de Dengue no Brasil e nas Américas. Extraído e adaptado de Nogueira et al, 2007.

O risco da introdução do DENV-4 no país era iminente, uma vez que este sorotipo circulava em países vizinhos como a Venezuela e Colômbia (Guzman e Kouri, 2002). Contudo, somente em 2010 ocorreram os primeiros casos de DENV-4 em Roraima e Amazonas. Em janeiro de 2011, foi isolado no Pará e, em março do mesmo ano, os primeiros casos de DENV-4 no Rio de Janeiro, introduzidos pelo município de Niterói (SVS 2011).

Outro fator foi determinante para aumentar a gravidade do problema, a dificuldade em programar o controle adequado do vetor em grandes comunidades urbanas, o que resultou no rápido espalhamento do vírus e no desenvolvimento de epidemias em vários estados.

Atualmente, não existe vacina contra nenhum dos sorotipos de DENV, de forma que a prevenção é a única forma de evitar a disseminação da doença, possível apenas com a quebra da cadeia de transmissão do vírus através da eliminação do vetor dos locais onde se reproduzem.

Além disso, dados da OMS de 2009 (WHO, 2009) reforçam a importância do diagnóstico mais preciso, pois os mesmos mostram que, sem diagnóstico e tratamento adequado, a taxa de mortalidade pode exceder 20%, enquanto que, com acesso a assistência médica e maiores chances de diagnóstico, esta taxa pode cair a 1%. Estes fatores demonstram que o diagnóstico precoce da doença é essencial para reduzir sua taxa de mortalidade, bem como as implicações sócio-econômicas decorrentes da doença (Kamil et al, 2006; Torres e Castro, 2007).

A mudança nos padrões da epidemiologia da Dengue parece ter uma causa multifatorial. O impacto da expansão das regiões endêmicas pelos quatro sorotipos do vírus e a associação entre as formas mais severas da doença e infecções secundárias tem sido bem documentado (Gubler, 2002; Halstead, 2007; Ooi e Gubler, 2009; Tapia-Conyer et al, 2009; Guzman e Istúriz, 2010; Guzman et al, 2010; San Martin et al, 2010). Esta propagação pode ser ainda mais exacerbada com a participação de outros vetores, como aconteceu no surto de 2001, no Havaí, onde o *Aedes albopictus* foi o principal vetor (Halstead, 2007; Knowlton et al, 2009; Lambrechts et al, 2010). Sugere-se que alguns sorotipos, genótipos e sequência da ocorrência das infecções também impactam na incidência das formas severas (Recker et al, 2009; Fried et al, 2010; Hang et al, 2010). Além disso, os fatores humanos, incluindo características genéticas, mudanças nos padrões de movimentação (das áreas rurais para as áreas urbanas, por exemplo) e longevidade, também parecem estar impactando na epidemiologia da Dengue. (Halstead et al, 2001; Halstead, 2006; Simmons e Farrar, 2009; Cummings et al, 2009). Estas mudanças no quadro epidemiológico da doença, juntamente com as outras dificuldades relacionadas anteriormente, são complicadores que fazem com que a produção de uma vacina seja um verdadeiro desafio (Tapia-Conyer et al, 2009; Simmons e Farrar, 2009; Guzman et al, 2010).

Recentemente, foi detectado o sorotipo 4 na região amazônica, na cidade de Manaus (Figueiredo et al, 2008). Esta ocorrência está relacionada à grande incidência deste sorotipo nos países que fazem fronteira com o Brasil, como a Venezuela e a Colômbia. Este relato refere-se ao primeiro isolamento registrado do sorotipo DENV-4 no Brasil em 25 anos. Tais descobertas reforçam a necessidade de uma vigilância epidemiológica constante e, para tal, os estudos nesta área devem estar associados aos de técnicas de diagnóstico modernas e mais eficientes. Além das técnicas clássicas, devem ser utilizados também ensaios moleculares para o controle adequado de novas epidemias e prevenção do aumento de casos fatais da doença (Medronho, 2006; Figueiredo et al, 2008; Medronho, 2008).

### 1.5. Diagnóstico laboratorial do Dengue

O diagnóstico eficiente e acurado da dengue é de extrema importância clínica (detecção precoce e confirmação de casos), atividades de vigilância, controle de surtos, patogenia, pesquisas acadêmicas, desenvolvimento de vacinas e testes clínicos.

Métodos diagnósticos laboratoriais para confirmar a infecção pelo vírus da dengue podem envolver detecção do vírus, ácido nucleico viral, antígenos ou anticorpos, ou uma combinação destas técnicas. Após o início da doença, na fase aguda, os vírus podem ser detectados no soro, plasma, células sanguíneas circulantes e outros tecidos por 4-5 dias. Durante os primeiros estágios da doença, isolamento do vírus, ácido nucleico ou antígenos podem ser utilizados para diagnosticar a infecção. No fim da fase de infecção aguda, a serologia para pesquisa de anticorpos IgM e IgG é o método de escolha para o diagnóstico (WHO, 2009).

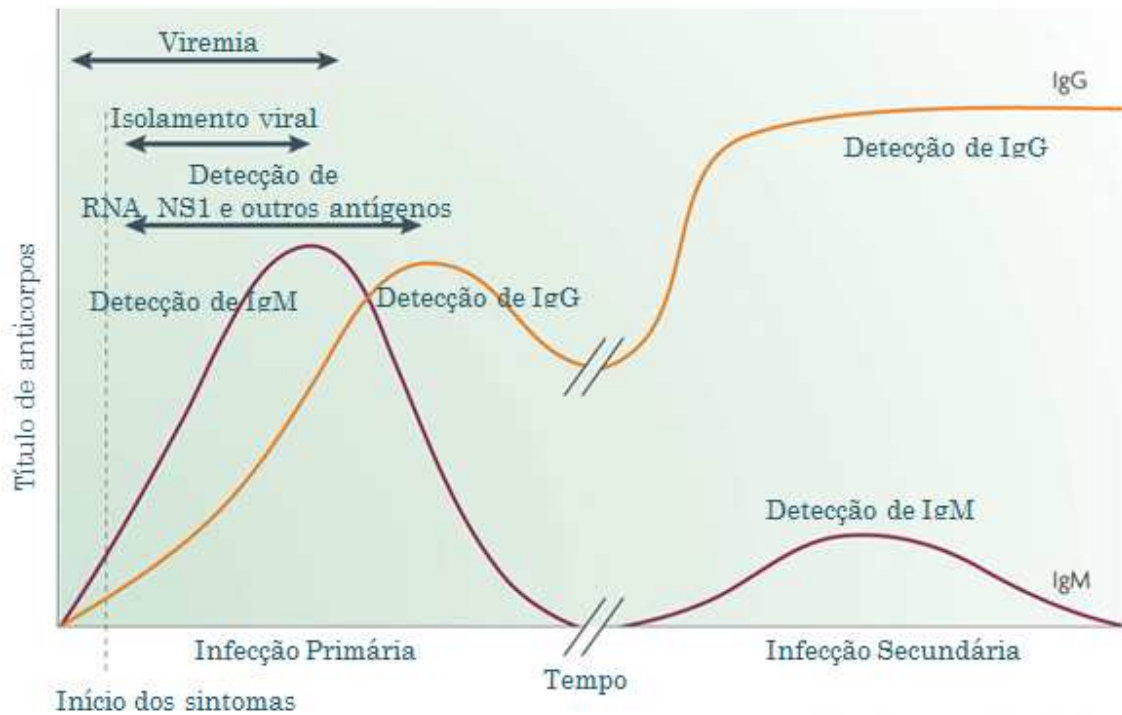
A resposta de anticorpos contra a infecção difere de acordo com o status imunológico do paciente. Quando a infecção por dengue ocorre em pessoas que não foram previamente infectadas por um flavivírus ou imunizadas com uma vacina flaviviral, como a da febre amarela, os pacientes desenvolvem uma resposta de anticorpos primária caracterizada pelo lento aumento de anticorpos específicos. Anticorpos IgM são as primeiras imunoglobulinas a aparecer. Estes anticorpos são detectáveis em 50% dos pacientes após 3-5 dias do início da doença, aumentando para 80% no 5º dia e 99% no 10º (Figura 1-10). O pico do nível de IgM ocorre cerca de 2 semanas após o início dos sintomas e então diminuem geralmente a níveis indetectáveis depois de 2-3 meses. Já as IgGs geralmente são detectáveis em títulos mais baixos e no final da primeira semana de doença, aumentando lentamente depois, com IgG sorológica ainda detectável após alguns meses, e provavelmente para toda a vida (Whitehead et al, 2007; Guy e Almond, 2008).

Durante uma infecção secundária, os títulos de anticorpos aumentam rapidamente e reagem amplamente contra muitos flavivírus. O isotipo de imunoglobulina dominante neste tipo de infecção é a IgG, que pode ser detectada em altos níveis, até mesmo durante a fase aguda, persistindo por períodos de 10 meses ao resto da vida. Os níveis iniciais de IgM em infecções secundárias são significativamente mais baixos que em infecções primárias, podendo até mesmo ser indetectáveis, dependendo do caso (Anderson et al, 2007). Para distinguir infecção primária de secundária de dengue, razões de anticorpos IgM/IgG e testes de avididade de IgG são mais comumente utilizadas atualmente que o teste de inibição da hemaglutinação (HI) (Shepard et al, 2004; Clark, 2005).

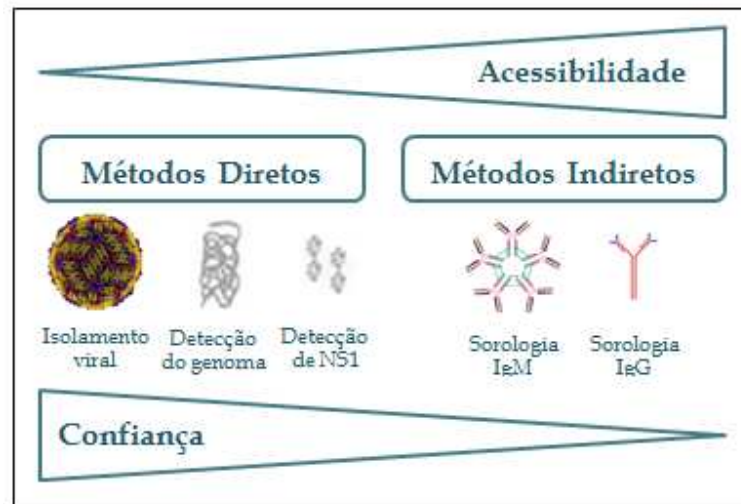
Muitos grupos de estudo mostraram que a razão IgM/IgG anti-DENV em soros coletados em nos primeiros 30 dias após o início dos sintomas pode ser usada para classificar acuradamente os pacientes como sofrendo infecção primária ou secundária (Innis et al, 1989; Kuno et al, 1991; Shu et al, 2003; de Souza et al, 2004; de Souza et al, 2007). A faixa de proporções discriminatórias 1,2-2,0, dependendo do laboratório ensaios e protocolos de interpretação. Na infecção primária, níveis elevados de IgM anti-DENV podem ser observados dentro de poucos dias após o início da doença, seguido, alguns dias depois, pela produção de IgG anti-DENV em níveis moderados (Guzmán e Kouri, 1996; Gubler, 1998; Vazquez et al, 2007; Koraka et al, 2001; Alcon et al, 2001; Schilling et al, 2004; As-Ngasang et al, 2006; Blacksell et al, 2008). Já na infecção secundária, IgM é detectada poucos dias depois e em níveis mais baixos do que na infecção primária, enquanto IgG rapidamente aumenta até níveis muito elevados (Innis et al, 1989; Guzmán e Kouri, 1996; Gubler, 1998; Vaughn et al, 1997; Vaughn et al, 1999; As-Ngasang et al, 2006; Vazquez et al, 2007). A avidéz dos anticorpos IgG anti-DENV é uma medida da intensidade com que a IgG se liga ao antígeno e também é um discriminador eficaz de infecções por DENV primárias e secundárias. Os estudos mostraram que, durante o primeiro mês após o início da doença, o valor da avidéz da IgG anti-DENV é tipicamente baixo em infecções primárias, mas alta nas infecções secundárias (de Souza et al, 2004; Matheus et al, 2005, Matheus et al, 2005b; de Souza et al, 2007; Domingo et al, 2009).

Uma série de métodos diagnósticos laboratoriais tem sido desenvolvida para apoio aos cuidados com o paciente e controle da doença. A escolha do método diagnóstico depende do objetivo com o qual o teste é feito (como diagnóstico clínico, vigilância epidemiológica, desenvolvimento de vacina), do tipo de instalações e conhecimento técnico de que o laboratório dispõe.

Em geral, testes com sensibilidade e especificidade altas requerem tecnologia e conhecimentos mais complexos, enquanto testes rápidos podem comprometer sensibilidade e especificidade em detrimento da facilidade de realização e rapidez. O isolamento do vírus e ácido nucleico são mais laboriosos e dispendiosos, mas também são mais específicos que os métodos sorológicos de detecção de anticorpos. A figura 1-11 mostra que existe uma relação inversa, em geral, entre a facilidade de uso ou acessibilidade de um dado método diagnóstico e a confiança nos resultados deste teste (WHO, 2009).



**Figura 1-10.** Variação do título de IgM e IgG nas respostas às infecções primária e secundária pelo vírus da dengue e os métodos diagnósticos que podem ser usados em cada etapa. Fonte: Adaptado de Guzman et al, 2010.



**Figura 1-11.** Comparação de testes diagnósticos de acordo com sua acessibilidade e confiança. Fonte: Adaptado de WHO, 2009.

A infecção pelo vírus da dengue produz um amplo espectro de sintomas, muitos dos quais são não específicos. Com isso, o diagnóstico baseado somente nos sintomas clínicos não é confiável. Confirmação laboratorial precoce do diagnóstico clínico pode ser valiosa porque

alguns pacientes podem progredir de dengue clássica para dengue severa, e às vezes até morte, em um curto período de tempo (WHO, 2009).

Até o 5º dia da doença, durante o período febril, infecções por dengue podem ser diagnosticadas através do isolamento viral em cultura de células, por detecção do RNA viral através de testes de amplificação de ácidos nucleicos, ou através da detecção dos antígenos virais por ELISA ou testes rápidos. O isolamento e a identificação dos DENVs em cultura de células normalmente levam alguns dias. Ensaios de detecção de ácidos nucleicos podem identificar o RNA do DENV em 24-48 horas. No entanto, estes testes requerem equipamentos e reagentes caros. Kits de detecção do antígeno NS1 estão comercialmente disponíveis e podem ser usados em laboratórios com equipamentos limitados e liberam resultados em poucas horas. O teste rápido de detecção de antígenos pode ser usado em estudos de campo e fornecer resultado em menos de uma hora (WHO, 2009).

Após o 5º dia, os DENVs e os antígenos desaparecem da corrente sanguínea e os anticorpos específicos já podem ser encontrados. Em alguns pacientes, o antígeno NS1 ainda pode ser detectado neste período. Testes sorológicos para dengue estão mais disponíveis em países endêmicos do que os testes virológicos. No entanto, os baixos níveis de IgM em infecções secundárias, ou a ausência das mesmas, diminuem a acurácia dos testes ELISA.

A metodologia aplicada pelo Ministério da Saúde para detecção precoce da circulação viral e controle de sua disseminação é o diagnóstico laboratorial utilizando *kits* para ensaios imunoenzimáticos (EIE) (Ministério da Saúde, 2002). A produção dos *kits* para EIE é baseada no clássico ensaio de ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) de captura de anticorpos do tipo imunoglobulina M (IgM) que aparecem mais precocemente do que as imunoglobulinas do tipo G (IgG) e, portanto, podem ser detectados nos primeiros dias de manifestação dos sintomas (Gubler, 1998).

O método de PCR em tempo real permite a rápida detecção do genoma do vírus causador da doença em até dois dias, acelerando e melhorando o processo de monitoramento da circulação do vírus. A busca por ensaios validados de PCR em tempo real para detectar e quantificar os quatro sorotipos de Dengue se tornou uma demanda das secretarias de saúde, uma vez que hoje não existe disponível nenhum PCR multiplex universal para os 4 sorotipos de Dengue (WHO, 2009).

## **1.6. Profilaxia**

Atualmente, a única forma de prevenir a Dengue é através do combate ao mosquito vetor. E tal forma de combate tem se mostrado cara e pouco efetiva, uma vez que depende da participação da população, o que dificulta a garantia de seu desempenho e funcionamento de forma adequada. E uma vez que a pessoa já esteja infectada, o principal é o diagnóstico rápido para que possa ser administrado o tratamento adequado (Rodriguez-Tan e Weir, 1998).

### **1.5.1. Vacinas de Dengue**

Após 60 anos de atividade do DENV e do início das pesquisas para o desenvolvimento de uma vacina, até o momento nenhuma vacina foi licenciada. No entanto, para doenças causadas por outros flavivírus, como Febre Amarela e encefalite japonesa, já existem vacinas efetivas e seguras há décadas.

Este fato se deve a uma série de fatores e o principal deles é o de a doença poder ser causada pelos 4 sorotipos diferentes, que circulam ao mesmo tempo em regiões endêmicas e são responsáveis por causar quadros hemorrágicos graves e de choque. Além disso, não existe um modelo animal experimental adequado. Primatas não humanos são susceptíveis ao vírus, mas desenvolvem uma viremia moderada e não ficam propriamente doentes, mesmo em casos de infecção secundária (Hombach, 2007).

Atualmente, existe uma série de vacinas candidatas em fases de testes clínicos. Este avanço reflete as décadas de pesquisa e desenvolvimento na área. Avanços significantes ocorreram nos últimos 10 anos e algumas vacinas estão se mostrando realmente promissoras em estudos clínicos, sendo que a mais avançada encontra-se em Fase 3 (Coller e Clements, 2011). No entanto, resultados recentes dos ensaios desta vacina já mostraram que ela não foi capaz de desenvolver proteção contra os 4 sorotipos da Dengue nos indivíduos vacinados (Halstead, 2012; Sabchareon et al, 2012).

Apesar das complicações específicas para o desenvolvimento de uma vacina contra dengue, os testes clínicos de vacinas candidatas atenuadas de forma clássica (por exemplo, de passagem por substratos celulares) tiveram início na década de 1980. Enquanto cepas atenuadas individuais foram desenvolvidas, a identificação de uma formulação tetravalente que não mostrasse interferência significativa entre os quatro vírus tem sido um desafio. Apesar disso, dois produtos alcançaram a Fase 2 dos testes clínicos (Kitchener et al, 2006; Sun et al, 2006; Sanchez

et al, 2006; Simasathien et al, 2008; Sun et al, 2009;). No entanto, a inabilidade de aferir atenuação adequada e a interferência entre os vírus não permitiu um avanço para fase 3 (Kitchener et al, 2006; Sanchez et al, 2006).

Mais recentemente, a aplicação de DNA recombinante no desenvolvimento de vacinas de Dengue promoveu avanços significativos e algumas vacinas candidatas estão progredindo nos estudos clínicos (Tabela 1-1). A mais avançada é a vacina tetravalente proposta pela Sanofi Pasteur (ChimeriVax-Dengue) que está passando por testes de eficácia em campo na Tailândia (Senior, 2009; Guy et al, 2010a) e recentemente entrou na fase 3 dos testes clínicos. A tecnologia desta vacina é baseada em quatro vírus recombinantes em que os genes prM e E de cada um dos quatro sorotipos virais de Dengue substituem os mesmos genes do vírus vacinal da Febre Amarela 17D (FA17D) (Guy et al, 2010a; Guy et al, 2010b). Desta forma, foram obtidos quatro vírus quiméricos de Febre Amarela 17D, que contém em seu genoma os genes prM/E de cada um dos sorotipos de Dengue. Os resultados das fases 1 e 2 sugerem que o produto é seguro e imunogênico, capaz de induzir respostas de anticorpos neutralizantes contra os quatro vírus em 77-100% das vacinas após administração de 3 doses de vacina em intervalos de 4-6 meses (Guy et al, 2008; Guy, 2009; Lang, 2009; Morrison et al, 2010; Guy et al, 2010a; Guy et al, 2010b). No entanto, esse intervalo entre as doses é maior que o utilizado para a maioria das vacinas licenciadas e poderia representar uma questão importante em termos de administração de todas as doses aos pacientes. Além disso, imunidade parcial durante o período de 12 meses pode fazer com que os vacinados em regiões endêmicas corram um risco a mais de desenvolver as formas exacerbadas da doença considerando que a proteção parcial da vacina, não protegeria contra uma infecção por um dos quatro sorotipos.

Outra abordagem desenvolvida pelo NIAID (Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas, do inglês *The National Institute of Allergy and Infectious Disease*) é a vacina tetravalente viva atenuada que compreende vírus recombinantes com estrutura molecular definida baseada em deleções na região não-codificante 3' do vírus e quimerização dos genes prM e E dos vários tipos de Dengue, assim como a ChimeriVax, mas usando um esqueleto de DENV-4 ao invés do FA17D (Blaney et al, 2006).



**Tabela 1-1.** Vacinas candidatas para Dengue. Extraído e adaptado de: Collier e Clements, 2011.

<b>Vacinas de Dengue candidatas em desenvolvimento clínico</b>			
<b>Vacina candidata</b>	<b>Abordagem da vacina</b>	<b>Instituição de desenvolvimento/Parceiro comercial</b>	<b>Estágio de desenvolvimento clínico</b>
<b>ChimeriVax-Dengue</b>	Vírus quiméricos baseados em um esqueleto de Febre Amarela 17D	Sanofi Pasteur	Fase 3
<b>LAV</b>	Vírus vivos atenuados de forma clássica derivados de passagem em células primárias de rim de cachorro	Walter Reed Army Institute of Research/GlaxoSmithKline	Fase 2
<b>TV Vaccine formulations</b>	Combinação de mutações/deleções definidas e quimeras	NIAID LID/Butantan, Biological E, Panacea, Vabiotech	Fase 1
<b>DENVax</b>	Vírus quiméricos baseados em um fundo de DENV2 PDK 53	Inviragen	Fase 1
<b>DEN-80E</b>	Subunidade recombinante de proteínas do envelope produzidas em células de inseto	Hawaii Biotech/Merck	Fase 1
<b>DIME-VR-P</b>	Vacina de DNA compreendendo os genes prM-E	Naval Medical Research Center	Fase 1

### **1.7. Uso do vírus amarelo vacinal 17D como vetor de expressão de proteínas heterólogas para produção de vacinas**

A vacina de Febre Amarela teve sua origem na década de 30, quando Max Theiler e colaboradores produziram uma cepa vacinal através de 176 passagens seriadas em embrião de macaco e em embrião de galinha, chamada 17D. Em 1951, Theiler recebeu o Prêmio Nobel por sua pesquisa que salvou muitas vidas (Gardner e Ryman, 2010). A cepa 17D deu origem a duas subcepas distintas, a cepa 17D-204 foi derivada a partir da passagem 204, enquanto a 17DD, desenvolvida por Biomanguinhos, foi derivada independentemente depois da passagem 195 a partir do subcultivo da 17D em ovos embrionados de galinha até a passagem 284 (Engel et al, 2006).

A vacina 17D é uma das mais efetivas vacinas já produzida. Nos 76 anos decorridos desde seu desenvolvimento, a vacina foi administrada em mais de 540 milhões de pessoas no mundo (Monath, 2005; Barrett e Teuwen, 2009). Existem seis produtores da vacina 17D (Brasil, USA, Inglaterra, França, Rússia e Senegal) (Vasconcelos et al, 2001), que produzem aproximadamente 30-60 milhões de doses por ano. Bio-Manguinhos (Fiocruz) é reconhecida

internacionalmente como fabricante da vacina febre amarela. Desde 1937, as preparações vacinais são obtidas em seus laboratórios, a partir da cepa atenuada 17D do vírus da febre amarela, cultivada em ovos embrionados de galinha livres de agentes patogênicos, de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (portal de Bio-Manguinhos, 2012). A vacina 17D ainda é produzida em embrião de galinha usando a tecnologia que pouco mudou desde 1945. O resultado da vacinação é uma infecção branda ou subclínica, e uma baixa viremia, que não excede 2 log<sub>10</sub> PFU/mL (Monath, 2007). Embora alguns estudos indiquem que a imunidade persiste em média por 45 anos, a Organização Mundial de Saúde indica a revacinação a cada 10 anos para a manutenção da imunidade (Barret e Teuwen, 2009).

A vacina de Febre Amarela produzida com a cepa 17D é uma das vacinas mais bem estabelecidas no mercado, tendo resposta bastante eficaz e duradoura. Estas qualidades fizeram com que o vírus FA17D se tornasse alvo de interesse para o desenvolvimento de novas vacinas, sendo usado como vetor de expressão de proteínas heterólogas (Galler et al, 1997; Monath, 1999; Bonaldo et al, 2000). Com o desenvolvimento da genética e a evolução da tecnologia do DNA recombinante, foi possível aplicar este conhecimento para estudo da estrutura dos flavivírus, o que possibilitou o desenvolvimento de novas vertentes para produção de vacinas.

Para permitir o desenvolvimento de uma vacina que utilize a cepa FA17D como vetor é necessário uma construção que não comprometa a estrutura e a replicação viral, que a construção do cDNA e seus transcritos não sejam patogênicos e que o vírus, além de estar atenuado, conserve suas características imunogênicas e expresse os genes heterólogos inseridos, podendo assim induzir a resposta desejada. A principal abordagem utilizada é a substituição dos genes prM e E de Febre Amarela por genes prM e E de outro flavivírus, a fim de produzir imunidade contra o segundo.

O primeiro vírus recombinante desenvolvido através da utilização de um esqueleto de cDNA do vírus FA17D teve seus genes prM/E trocados por genes prM/E de uma cepa vacinal do vírus da encefalite japonesa. O vírus quimérico criado era imunogênico, geneticamente estável e induzia resposta eficaz contra a encefalite japonesa (Chambers, 1999; Guirakhoo et al, 1999; Monath e cols, 2000; Arroyo et al, 2001). Depois disso, muitos grupos de pesquisa utilizaram esta mesma metodologia para desenvolver vírus recombinantes. Inicialmente para Dengue 2 (17D-DENV-2) (Guirakhoo et al, 2001) e depois para os outros 3 sorotipos (17D-DENV-1, 17D-DENV-3 e 17D-DENV-4) (Guirakhoo et al, 2004; Galler et al, 2005), da mesma forma, para o vírus do Oeste do Nilo (Arroyo et al, 2004).

Por pertencerem a mesma família (*Flaviviridae*), mesmo gênero (*Flavivírus*) e possuírem as mesmas características estruturais do genoma, foi possível construir uma vacina viva atenuada quimérica de Dengue usando a estrutura genética da cepa vacinal de febre amarela, através da inserção da região prM/E, que codifica as proteínas de membrana e de envelope, do DENV em um clone da linhagem vacinal 17D do vírus da Febre Amarela. Espera-se que esta vacina seja capaz de estimular resposta imunológica protetora em humanos, principalmente humoral, com a produção de anticorpos neutralizantes contra Dengue.

Em Biomanguinhos está sendo desenvolvida uma vacina com vírus recombinantes Dengue e Febre Amarela (FA17D/DENV1, 2, 3 e 4). Todos os vírus recombinantes obtidos foram biologicamente e geneticamente caracterizados e a imunogenicidade testada em sistema murino e de primatas não-humanos, encerrando a fase de prova de princípio do projeto, o que significa que a vacina candidata é capaz de gerar resposta imunológica satisfatória contra os 4 sorotipos do vírus Dengue.

### **1.7.1. Quimeras de Dengue**

#### **1.7.1.1. Origem dos vírus da dengue**

Para a construção das quimeras foram selecionadas várias cepas dos quatro sorotipos de Dengue, brevemente descritas abaixo.

Para a construção da quimera FA17D/DEN1, três isolados distintos foram utilizados, a cepa DENV-1 60305, pertencente ao genótipo V ou genogrupo das Américas/África (Rico-Hesse, 2003), isolada de um paciente com quadro de Dengue clássico durante uma epidemia em 1998 em Pinheiral (estado do Rio de Janeiro), a cepa DENV-1 BR42735 pertencente também ao genótipo V, isolada durante uma epidemia em 1997 na cidade de Recife (Estado de Pernambuco) de um paciente com quadro de Dengue clássico, e a cepa DENV-1 16007 pertencente ao genótipo II (Gonçalvez, 2002) ou genogrupo da Tailândia, isolada do soro de um caso de Dengue hemorrágico na Tailândia.

Para a construção da quimera FA17D/DEN2, 4 isolados distintos foram utilizados, o vírus DENV-2 40247 pertencente ao genótipo III, genogrupo do sudeste asiático introduzido nas Américas (Rico-Hesse et al, 1997), originado de um caso de Dengue hemorrágico em Niterói (estado do Rio de Janeiro) (Nogueira et al, 1991), o vírus DENV-2 44-2 pertencente também ao genótipo III (Rico-Hesse et al, 1997; Miagostovich et al, 2003), originado de um isolado de um caso de Dengue clássico (56344; Vitória, Estado do Espírito Santo), o vírus DENV-2 BR3808

pertencente ao genótipo do Oeste da Ásia/América (Rico-Hesse et al, 1997) isolado de um caso de Dengue clássico, durante uma epidemia em 1995 na cidade de Recife (Estado de Pernambuco), e o DENV-2 16681, isolado de um paciente com Dengue hemorrágico em Bangkok em 1964 (Halstead, 1970).

Para a construção das quimeras FA17D/DEN3, 4 linhagens distintas foram utilizadas. O vírus DENV-3 H87 que é uma cepa protótipo isolado em 1956 de um paciente com Dengue hemorrágico nas Filipinas (Hammon et al, 1960) pertencente ao genótipo II ou Sudeste Asiático/Pacífico Sul. O vírus DENV-3 16562 foi isolado do soro de um caso de Dengue hemorrágica nas Filipinas, pertence ao mesmo genótipo (Sudoeste Asiático/ Pacífico Sul; Rico-Hesse, 2003). O vírus DENV-3 74886 foi isolado em 2002 de um caso fatal de síndrome de choque por Dengue em Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro. Este pertence ao sub-tipo III (Sri Lanka/Índia), o qual é o genogrupo circulante no Continente Americano (Rico-Hesse, 2003; de Simone et al, 2004). Enquanto o vírus DENV-3 BR95016 foi isolado de células de mosquito C6/36 de um caso de Dengue clássico durante uma epidemia em 2002 em Recife, vírus também pertence ao genótipo III.

A construção da quimera FA17D/DEN4, foi realizada a partir do cDNA oriundo da linhagem DEN4 Venezuela 1988, uma vez que o vírus dengue 4 não era circulante no Brasil no momento da construção.

O projeto de desenvolvimento da vacina recombinante contra Dengue em Bio-Manguinhos teve início em 1999 e as quimeras dos quatro sorotipos de Dengue utilizadas no projeto foram construídas a partir da cepa vacinal de Febre Amarela 17D e das cepas de Dengue listadas acima (Caufour et al, 2001; Mateu et al, 2007).

O processo de desenvolvimento desta vacina atualmente se encontra na fase de estabelecimento das condições de produção e início dos testes pré-clínicos, onde serão avaliadas imunogenicidade e neurovirulência do lote-semente em murinos e primatas não humanos. O sistema de lote-semente é um sistema no qual sucessivos lotes são produzidos a partir de um mesmo lote-semente mãe, com um determinado número de passagens. Para uma produção de rotina, como a de vacinas, um lote-semente de trabalho, ou secundário, é preparado do lote-semente primário. Desta forma, o produto final é derivado do lote de trabalho o qual, não passou por mais passagens celulares que o lote primário. Isto garante que o produto final tenha a mesma segurança e eficácia que o produto testado nos ensaios clínicos.

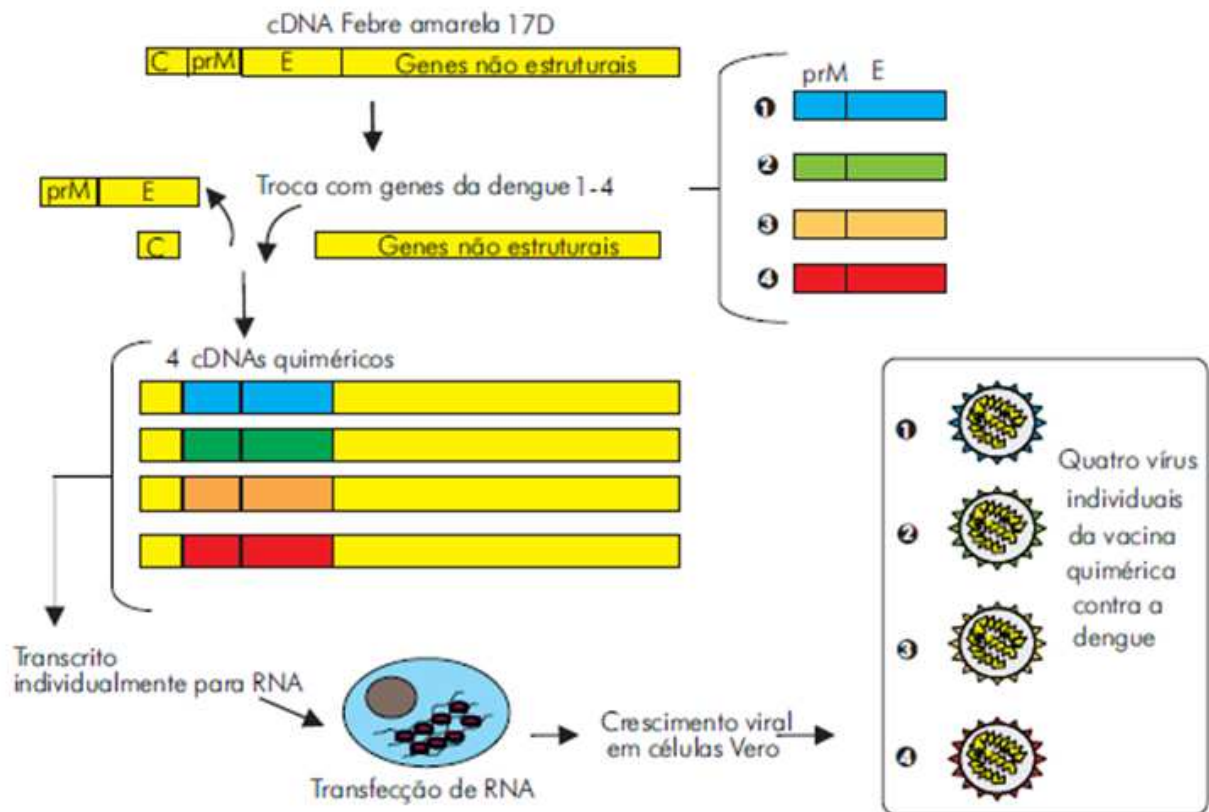
Os DENVs selvagens mencionados acima foram usados na construção dos vírus recombinantes. Para isso, inicialmente, foram sintetizados os cDNAs de cada DENV e do vírus FA17D. A região que compreende os genes prM e E do cDNA FA17D foi então substituída por cada uma das regiões correspondentes dos cDNAs de DENV. A partir dos cDNAs quiméricos construídos, foi produzido o RNAm dos vírus, utilizando sistemas de clonagem bacteriano (*Escherichia coli*) e de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Os RNAs foram então tranfectados em células Vero, separadamente e, desta forma, foram sintetizados os vírus quiméricos, que apresentam maquinaria de FA17D, mas envelope de DENV (Figura 1-12).

A tabela abaixo (Tabela 1-2) mostra quais foram as cepas utilizadas para construção dos vírus recombinantes que fazem parte da futura candidata a vacina.

Dentre as quimeras descritas acima, foram selecionadas uma de cada sorotipo, que apresentou maior estímulo da resposta de anticorpos nos testes em primatas, (FA17D/DEN1 (PE), FA17D/DEN2(PE), FA17D/DEN3H87#3 e FA17D/DEN4) para que se desse seguimento ao desenvolvimento da vacina tetravalente recombinante contra a Dengue.

**Tabela 1-2.** Vírus recombinantes e o processo pelo qual foram formadas.

Vírus	Cepa	Sistema de Clonagem		Vírus Recombinantes
Dengue-1	Miranda 95	pACNR1180	<i>E. coli</i> cepa DH5α	FA/D1 MIR 95
Dengue-1	BR42735	pBSC	<i>S. cerevisiae</i> cepa RFY206	FA/D1 (PE)
Dengue-2	44/2 e NGC	pACNR1180	<i>E. coli</i> cepa XL1-blue	FA/D2 (44/3)
Dengue-2	BR3808	pBSC	<i>S. cerevisiae</i> cepa RFY206	FA/D2 (PE)
Dengue-3	BR95016	pBSC	<i>S. cerevisiae</i> cepa RFY206	FA/D3 (PE)
Dengue-3	H87	pBSC	<i>S. cerevisiae</i> cepa RFY206	FA/D3 H87#3
Dengue-3	16562	pBSC	<i>S. cerevisiae</i> cepa RFY206	FA/D3 16562#5
Dengue-4	Venezuela 88	pACNR1180	<i>E. coli</i> cepa DH5α	FA/D4



**Figura 1-12.** Esquema da construção dos vírus quiméricos de Febre Amarela e Dengue sintetizados e utilizados no projeto de vacina recombinante tetravalente contra Dengue do PVIR/VDTEC – Bio-Manguinhos.

### 1.8. Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das principais técnicas de biologia molecular, sendo amplamente utilizada em muitas áreas. Foi desenvolvida por Kary Mullis na década de 1980 e permite amplificar trechos específicos de DNA e RNA, seja simplesmente para criar múltiplas cópias de determinada amostra de DNA, seja para comparar diferentes amostras de DNA e verificar qual a de maior abundância. Estratégias baseadas na PCR impulsionaram o avanço da biologia molecular, permitindo aos pesquisadores a manipulação do DNA, facilitando procedimentos, como a clonagem, e grandes empreendimentos, como o Projeto Genoma Humano (Valasek e Repa, 2005).

Existem diversos fatores que podem fazer com que uma PCR falhe, como a presença de inibidores, o estado de degradação do DNA, quantidade do alvo insuficiente, contaminação cruzada ou uma combinação de todos estes fatores. Neste contexto, Higuchi e colaboradores (1993) descreveram a técnica que permitia o monitoramento da PCR em tempo real, ao longo de

todos os ciclos, ao acoplar uma câmera de vídeo que permitia detectar o aumento da fluorescência durante a reação, que ocorria devido a ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA recém sintetizadas.

A PCR em tempo real (qPCR) representa outro salto tecnológico, que permitiu a aplicação da PCR com outros fins para pesquisadores em todo o mundo, em parte porque a enorme sensibilidade da PCR foi associada à precisão proporcionada pelo monitoramento em tempo real dos produtos gerados na reação, permitindo a quantificação exata do número de cópias presentes em cada reação (Valasek e Repa, 2005). Esta metodologia foi desenvolvida com o objetivo de aperfeiçoar a PCR, tornando-a mais eficiente, rápida e segura, empregando-se o ácido nucleico alvo (DNA ou cDNA) extraído de tecidos, fluidos de pacientes ou de cultura de células infectadas (Manojkumar e Mrudula, 2006).

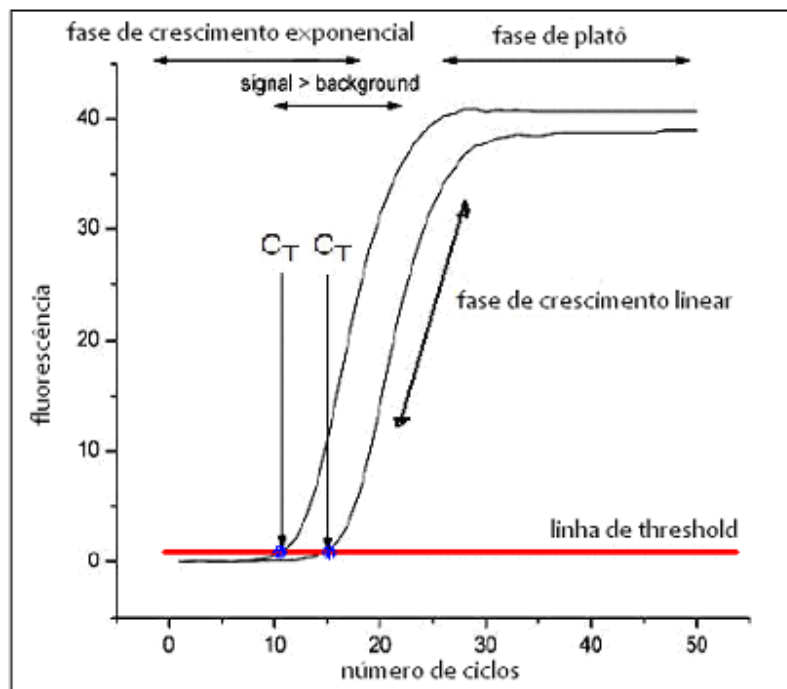
A reação de qPCR acontece da mesma forma que a PCR tradicional, exceto pelo fato de que a reação é monitorada em tempo real por um detector de emissão de fluorescência. Para isso, é necessária uma plataforma de instrumentação que contenha um termociclador com sistema óptico para excitação e recolha da emissão de fluorescência, assim como um computador com *software* próprio para aquisição de dados e análise final da reação.

Seguindo o mesmo procedimento que a PCR tradicional, apresenta suas três fases características: fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária (Kubista et al, 2006). Estas fases podem ser observadas em um gráfico (gráfico de amplificação) de fluorescência em função do número de ciclos da PCR (Figura 1-13). A fase que garante maior eficiência, de aproximadamente 100%, para quantificar o produto da PCR é a fase exponencial, a melhor fase para se estudar a reação (Heid et al, 1996).

Existe um ponto onde a reação atinge o limiar da fase exponencial, onde o nível de fluorescência excede um limiar arbitrário, definido pelo *software* da qPCR. Este limiar é chamado *threshold* e este ponto corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável, ou seja, que atravesse o limiar estabelecido, e é chamado de *cycle threshold* ( $C_T$ ) (Heid et al, 1996; Nicklas e Buel, 2003; Kubista et al, 2006). Quanto menor este número, maior o número de moléculas de DNA iniciais introduzidas na PCR (Figura 1-14). Para quantificar as amostras, são usadas amostras de DNA de concentração conhecida para confecção de uma curva padrão, baseada nos valores de  $C_T$  de cada amostra, já que existe uma proporção linear entre o valor de  $C_T$  e o logaritmo da concentração de DNA (Figura 1-15).

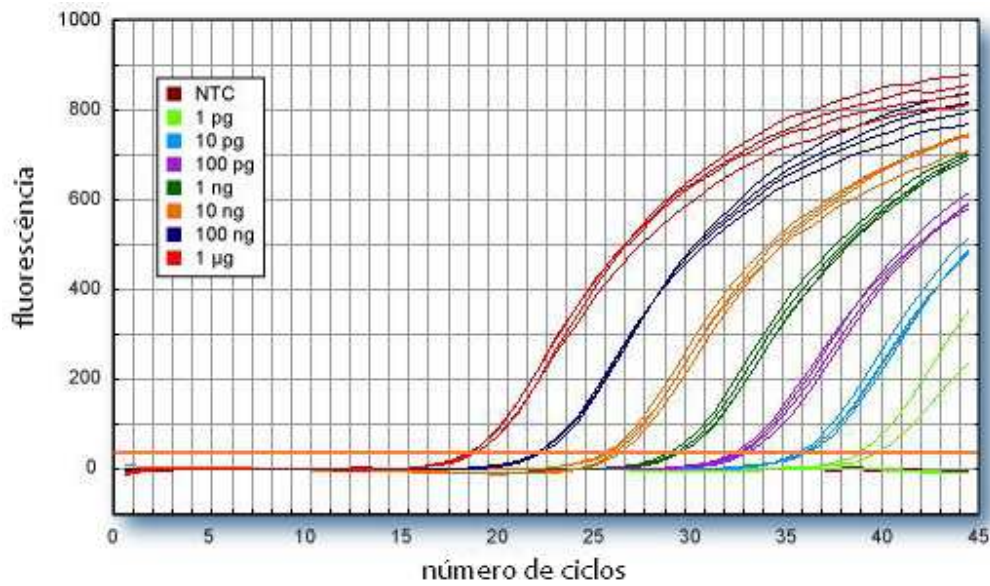
Outros fatores importantes na reação de tempo real são o *baseline*, que são os ciclos iniciais da reação, onde a fluorescência se mantém baixa, como um “ruído de fundo”, o cálculo deste valor ajuda a determinar quando a amplificação de um alvo está suficientemente acima do ruído; o *slope*, calculado a partir da curva padrão, é usado para calcular a eficiência da reação, seus valores ideais variam entre -3,8 a -3,1; a eficiência da reação, que deve estar sempre entre 90% e 115% e pode ter seu valor alterado por comprimento do amplicon, presença de inibidores ou desenhos dos oligonucleotídeos; o  $R^2$ , ou coeficiente de determinação, que deve encontrar-se o mais perto possível de 1 e é usado para avaliar o ajuste da curva padrão aos pontos dos dados representados no gráfico; o *Y-Interceptor*, que representa o número de ciclos necessários para a quantificação de 1 única cópia de DNA, valores em torno de 40 indicam boa sensibilidade do ensaio (Dorak, 2012).

Desde que exista precisão e consistência nos  $C_T$ s das amostras de concentração conhecida (controle positivo e negativo), o valor de  $C_T$  de qualquer outra amostra, de concentração desconhecida, pode ser comparado a essa curva padrão e sua concentração inicial facilmente calculada (Heid et al, 1996; Kubista et al, 2006).

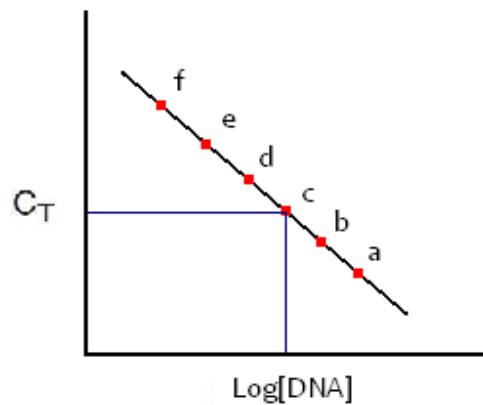


**Figura 1-13.** Fases e curvas de resposta do PCR em tempo real. Adaptado de Kubista et al, 2006.





**Figura 1-14.** Sete curvas de resposta do PCR em tempo real com diferentes concentrações de DNA inicial, desde 1 pg a 1 µg. Fonte: Retirado de <http://bwhpathology.partners.org/tcrnd.aspx> (em 15/09/09).



**Figura 1-15.** Curva Padrão obtida por diferentes amostras de concentrações conhecidas de DNA (a,b,c,d,e). Numa escala logarítmica os CT correspondem ao número inicial de moléculas. Fonte: Adaptado de Butler, 2005.

A qPCR necessita, além do par de iniciadores, de um marcador fluorogênico que se ligue ao DNA de fita dupla amplificado. Sendo assim, quanto maior o sinal emitido, maior a quantidade de produto gerado. A vantagem é que, com isso, é possível observar a eficiência da reação e obter resultados mais confiáveis, sem a necessidade de submeter o produto do PCR a uma reação de eletroforese em gel (Heid et al, 1996).

Em geral, pequenos amplicons (150 pb) são gerados para realizar uma reação de PCR, o fato de os amplicons serem pequenos faz com o que o tempo de reação também seja, permitindo assim um tempo menor de reação (cerca de 15 segundos) e também, fazendo com que os oligonucleotídeos e sondas, possam competir com maior eficiência para o pareamento com suas respectivas sequências complementares. Para determinar a combinação de oligonucleotídeos e sondas marcadas para um determinado alvo genômico, são usados softwares específicos nos quais os parâmetros configurados assemelham-se às condições encontradas nas amplificações experimentais (Niesters, 2001).

A qPCR consiste, portanto, em montar uma mistura de iniciadores, direto e reverso específicos, e um marcador fluorogênico (específico ou não) para uma região de interesse do DNA de determinada espécie, e adicionar o RNA ou DNA molde. No caso de pesquisa de genes de espécies que tenham como material genético o RNA, inicialmente é preciso sintetizar uma cadeia complementar de DNA (cDNA). A reação pode ser realizada em uma única etapa, onde toda a reação desde a síntese do cDNA até a amplificação por PCR ocorre em um único tubo, ou em uma reação de duas etapas, onde a transcrição reversa e a amplificação por PCR ocorrem em reações distintas. Acreditava-se que uma reação única minimizaria a variação experimental devido a ambas as reações enzimáticas ocorrerem em um único tubo, porém como o RNA é muito instável e degrada muito rápido, na verdade necessita uma manipulação mais cuidadosa e veloz para evitar o comprometimento do experimento. Além disso, os protocolos de única etapa se mostraram com menor sensibilidade que o de duas etapas, apesar deste ter maior chance de contaminação (Wong e Medrano, 2005).

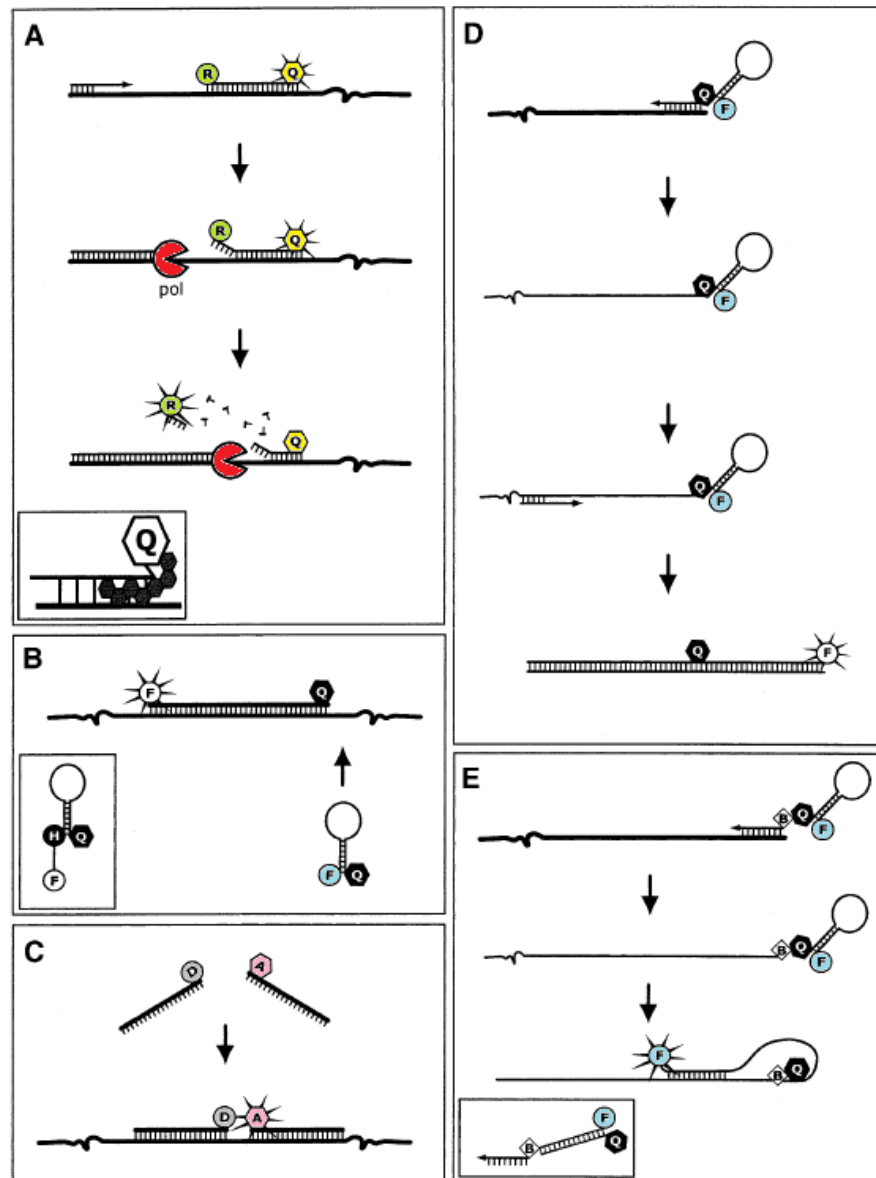
Existem diversas abordagens para a realização da qPCR. O composto fluorescente utilizado na reação pode ter dois comportamentos distintos, dando origem às duas mais utilizadas tecnologias: *SYBR<sup>®</sup> Green* e *TaqMan<sup>®</sup>*. Na primeira, o fluorocromo não é específico para uma determinada sequência de DNA, detectando e ligando-se a qualquer produto de cadeia dupla da PCR, sendo a especificidade da detecção e quantificação devida, unicamente, à especificidade dos iniciadores. Já a segunda requer um fluorocromo ligado a uma sonda com especificidade para uma sequência de DNA e que detecta somente esta sequência em todos os produtos da PCR (Figura 1-14) (Alonso et al, 2003; Nicklas e Buel, 2003).

### 1.8.1. SYBR<sup>®</sup> Green

A tecnologia SYBR<sup>®</sup> Green se baseia em moléculas que se ligam às cadeias duplas de DNA e, quando excitadas, emitem uma fluorescência verde. As moléculas não ligadas deste composto apresentam fluorescência fraca, produzindo um sinal mínimo, que é utilizado como “ruído de fundo”. Ao longo da PCR, após o reconhecimento dos iniciadores, as moléculas de SYBR<sup>®</sup> Green se ligam à cadeia dupla de DNA pré-sintetizada pela polimerase. Desta forma, pode ser monitorada a quantidade crescente de fluorescência e, conseqüentemente de DNA amplificado, ao longo da reação e no fim da fase de extensão de cada ciclo (Vitzthum e cols, 1999) (Figura 1-16). Apesar de apresentar baixo custo, fácil utilização e alta sensibilidade, este método possui a desvantagem de suas moléculas se ligarem a todo DNA de cadeia dupla amplificado durante a reação, incluindo dímeros de iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo levar a uma superestimação do fragmento alvo. Para diminuir esta superestimação, é feita a análise da curva de dissociação.

Todo DNA de fita dupla tem uma temperatura de dissociação (T<sub>M</sub>), na qual 50% do DNA é fita simples. A temperatura de dissociação depende da extensão, da ordem da sequência, quantidades de G:C e do pareamento Watson-Crick. Quando corantes são usados, conforme o fragmento é aquecido, uma repentina diminuição na fluorescência é detectada quando a T<sub>M</sub> é alcançada (devido à dissociação das fitas de DNA e liberação da sonda). Este ponto é determinado a partir do ponto de inflexão da curva de fusão ou do pico de dissociação do gráfico derivativo (o que se entende por gráfico derivativo é a primeira derivada negativa da curva de dissociação). A mesma análise pode ser feita quando oligonucleotídeos de hibridização marcados são usados já que eles permanecem intactos após a PCR. Pelo fato de que os oligonucleotídeos marcados serem clivados durante a PCR, não é possível obter uma curva de dissociação se eles foram usados (e por causa da sua especificidade, também não há necessidade). A análise da curva de dissociação pode ser utilizada em análise de mutações conhecidas e desconhecidas (novo), como uma nova mutação irá criar um pico adicional ou mudar a área de pico (Ririe et al, 1997).

Com isso, o SYBR<sup>®</sup> Green só pode ser utilizado em reações *singleplex*, uma vez que não é específico a uma determinada sequência de DNA (Niesters, 2001; Alonso et al, 2003; Nicklas e Buel, 2003; Novais e Pires-Alves, 2004).



**Figura 1-16.** Tipos de sonda para PCR em tempo real. (A) Sonda nuclease 5': enquanto a DNA polimerase (pol) progride na fita relevante, ela desloca e hidrolisa a sonda no sentido 5'-3' através de atividade endonuclease. Quando a molécula emissora de fluorescência (R) é removida da influência extintora da molécula supressora (Q), ela é capaz de liberar energia em um comprimento de onda que é monitorado pelo equipamento e diferente da emitida pela molécula supressora. (B) Sonda tipo grampo: a hibridização da sonda no alvo separa o fluoróforo (F) e a molécula não fluorescente (Q) o suficiente para permitir a emissão pelo fluoróforo excitado. (C) Sondas adjacentes: a hibridização adjacente resulta em um sinal FRET devido à interação entre os fluoróforos doador (D) e receptor (A). Esse sistema bimolecular obtém seus dados através da emissão do receptor, ao contrário do que acontece com a sonda nuclease. (D) Iniciadores marcados: a fita oposta é duplicada para que a estrutura em grampo do iniciador possa ser desfeita. Isto separa as duas moléculas, de um modo semelhante ao que ocorre com as sondas em grampo. (E) Iniciadores Escorpião: o iniciador não necessita da extensão da fita complementar, na verdade, ele bloqueia a extensão para garantir que o grampo na sonda só seja desfeito pela hibridização específica com a sequência complementar. Fonte: Mackay et al, 2002.

### 1.8.2. *TaqMan*<sup>®</sup>

A tecnologia *TaqMan*<sup>®</sup> é baseada na detecção da atividade exonucleotídica 5'-3' da Taq DNA polimerase (Holland et al, 1991). Neste sistema são utilizados dois iniciadores específicos e uma sonda *TaqMan*<sup>®</sup> homóloga à região do fragmento de DNA entre os iniciadores. Esta sonda é marcada com dois corantes fluorescentes, uma molécula que emite fluorescência (*reporter*) na extremidade 5' e uma molécula supressora (*quencher*), capaz de capturar a fluorescência emitida pela primeira, na extremidade 3'. No início da reação, a sonda está intacta e, devido à proximidade física das duas moléculas, e a habilidade de uma capturar a emissão de fluorescência da outra, a emissão de fluorescência pela sonda é baixa. No decorrer da amplificação a sonda é hibridizada ao DNA e é hidrolisada pela polimerase, que tem atividade exonucleotídica 5'-3' durante a extensão da fita complementar. Com a hidrólise, as moléculas emissora e supressora de fluorescência são separadas, permitindo a detecção da fluorescência emitida e, ao longo da reação, conforme mais fragmentos são amplificados, aumenta o sinal fluorescente emitido, até que este ultrapasse o limiar e possa ser detectado (Heid et al, 1996; Alonso et al, 2003; Nicklas e Buel, 2003) (Figura 1-17).

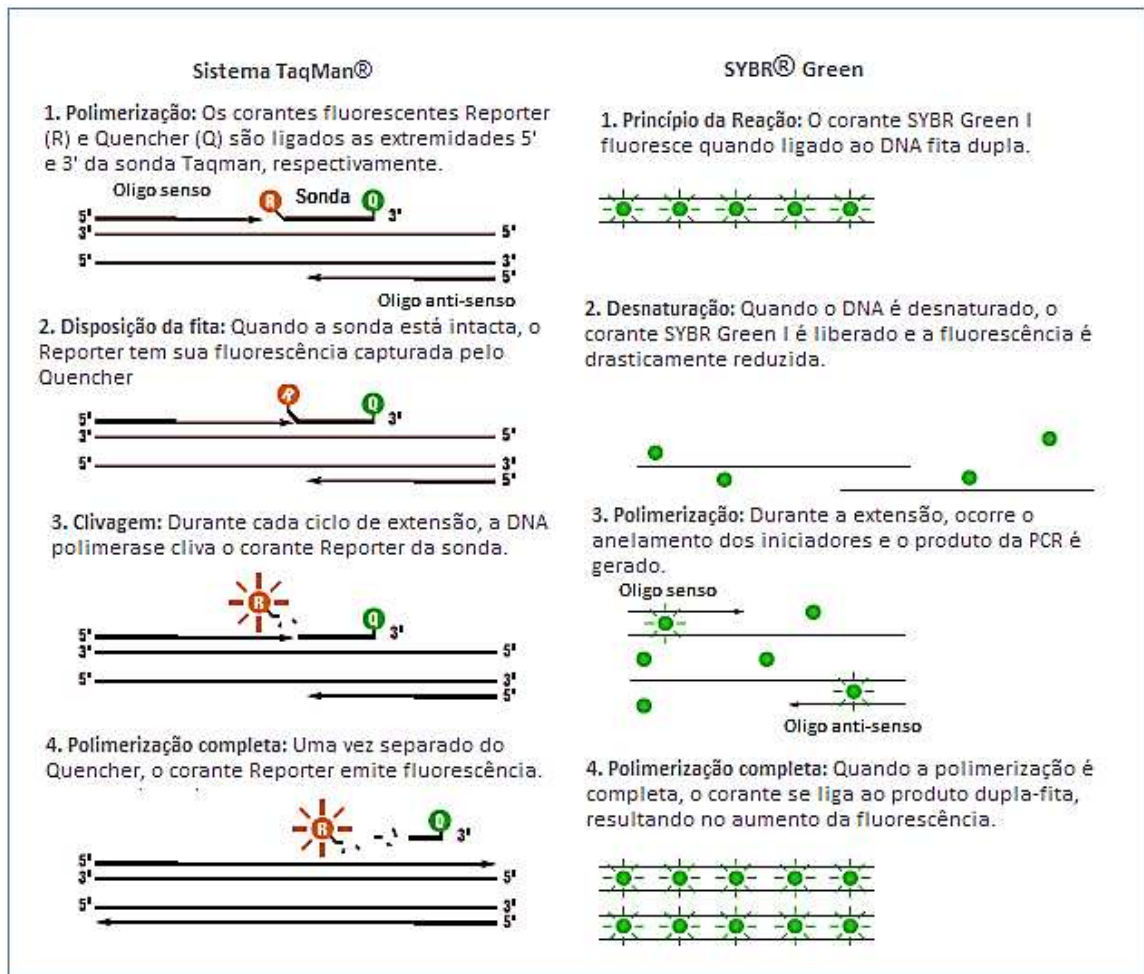
A grande vantagem desta técnica é a sua especificidade, visto que apenas se amplifica, detecta e quantifica a sequência alvo pretendida (Heid et al, 1996), apesar de ser uma tecnologia de difícil delineamento devido à necessidade de amplificação e hidrólise eficientes. Além disso, o fato de as sondas serem marcadas em ambas as extremidades eleva o custo da reação. Além dos benefícios comuns a qualquer reação de qPCR, esta tecnologia permite a obtenção de resultados com alta sensibilidade, maior precisão e menor risco de contaminação, além de possibilitar diferentes tipos de análise simultaneamente (Heid et al, 1996; Alonso et al, 2003; Butler, 2005; Kubista et al, 2006).

Existem diversos fluoróforos que podem ser utilizados na marcação de sondas, e cada um deles emite luz em um comprimento de onda diferente. Esta é uma das características que permite o desenvolvimento de reações “*multiplex*” (por exemplo, uma única reação, contendo os pares de iniciadores específicos para cada um dos 4 sorotipos de Dengue), já que o leitor é capaz de diferenciar a detecção de fluoróforos distintos que emitem luz em diferentes comprimentos de onda (QIAGEN) (Figura 1-18).

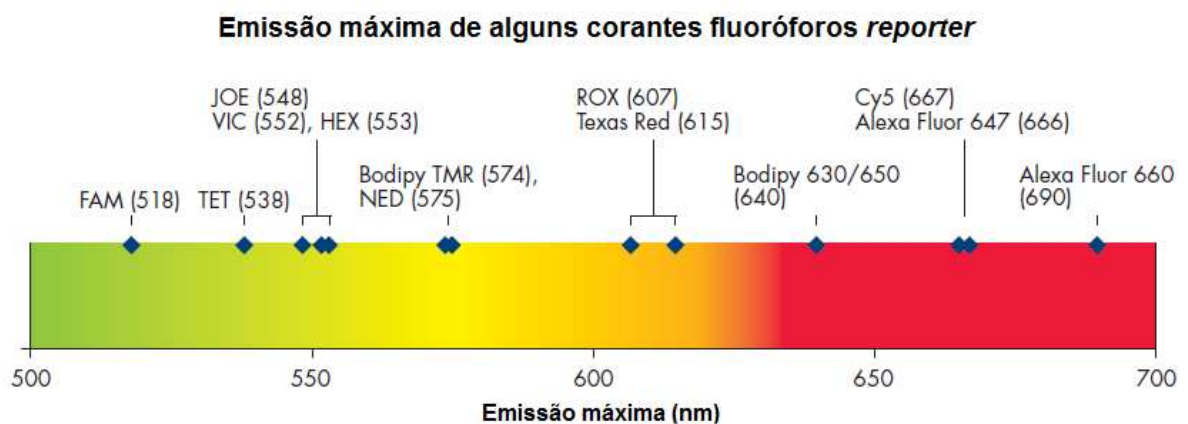
A rapidez da qPCR é devida principalmente à remoção de procedimentos de detecção dos produtos amplificados (revelação de gel de agarose em luz ultravioleta). Comparado ao PCR convencional, esse processo apresenta várias vantagens: mais rápido, com menos etapas, menor

chance de contaminação e a capacidade de monitorar o produto da PCR dentro do próprio tubo da reação (sistema fechado); o uso de múltiplos fluoróforos associados à diferentes sondas, os quais apresentam comprimentos de ondas diferentes, tornando possível a detecção de mais de um alvo molecular em uma mesma reação, e, por último, a maior vantagem é a possibilidade de quantificação absoluta, uma vez que a fluorescência gerada em um determinado  $C_T$  permite estimar a concentração inicial do ácido nucleico alvo presente na amostra que se quer quantificar (Mackay et al, 2002).

Para a manutenção da alta qualidade de um resultado laboratorial, é necessária a padronização destes métodos. O diagnóstico laboratorial deve ter acurácia e rapidez, com uma boa relação custo benefício. O desafio atual no estudo de doenças humanas virais inclui a aplicação de técnicas modernas para evitar reações cruzadas entre amostras de origens diferentes, cepas e sorotipos, assim como o desenvolvimento de diretrizes de padronização internacionais para a implementação de garantia de qualidade nesses testes laboratoriais (Manojkumar e Mrudula, 2006).



**Figura 1-17.** Esquema comparativo das reações de qPCR com os sistemas *TaqMan*® e *SYBR*® Green. Fonte: Applied Biosystems [http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/TaqMan-and-sybr-green-chemistries.html].



**Figura 1-18.** Espectro com exemplos de alguns dos fluoróforos mais utilizados na técnica de qPCR e seus respectivos comprimentos de ondas. Fonte: QIAGEN.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral:

- Estabelecer um protocolo de RT-PCR em tempo real para quantificação das quimeras dos quatro sorotipos de Dengue, do projeto de desenvolvimento da vacina de vírus vivo atenuado recombinante (17D/Dengue) do PVIR/VDTEC, desenvolvida no LATEV.

### 2.2. Objetivos Específicos:

- Estabelecer a concentração de primers para reações em etapa única com cada quimera.
- Comparar o sistema *TaqMan*<sup>®</sup> etapa única com o sistema *SYBR*<sup>®</sup> *Green* etapa única.
- Acompanhar a cinética de propagação viral em *cell factory* dos quatro sorotipos de quimeras com os sistemas *TaqMan*<sup>®</sup> e *SYBR*<sup>®</sup> *Green*.
- Analisar a cinética de propagação viral da quimera 17D/Den 3 realizada em garrafas estacionárias utilizando os dois sistemas.
- Comparar os resultados observados nas PCR-qRT (em cópias/mL) com a quantificação feita através do ensaio de formação de placa de lise (em PFU/mL).



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Cultivo e manutenção de células Vero

Vero é uma linhagem certificada (CCL – *Certified Cell Line*) de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto, As células foram obtidas através da Coleção Americana de Culturas e Depósitos (ATCC, 1994) pertencem à linhagem CCL-81. Esta linhagem celular é aceita como adequada para a produção e padronização de vacinas e não produz interferon do tipo I, devido a uma deleção cromossomal.

A partir de banco de células armazenado a  $-196^{\circ}\text{C}$ , a citada linhagem foi expandida e mantida em meio 199 com sais de Earle (10x) (*Sigma*<sup>®</sup>), tamponado com bicarbonato de sódio gaseificado 4,4%, pH 7, suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (*Cultilab*<sup>®</sup>) e antibiótico 1% (Sulfato de gentamicina 4 mg/mL) com incubação sem agitação em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . As culturas foram submetidas a passagens semanais e uma parte dessas culturas era destinada ao nosso trabalho.

As células foram preparadas para os ensaios de cinética de propagação e titulação com 24 horas de antecedência para os ensaios realizados em garrafas estacionárias, e com 48 horas de antecedência para os ensaios de cinética em *cell factories*. As monocamadas confluentes em frascos de manutenção de  $175\text{ cm}^2$  foram tratadas com uma solução de tripsina/EDTA a 1% em PBS por 5 minutos em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Uma vez dissociadas, as células foram suspensas em 5mL de meio completo (10% Earle 199, 5% de  $\text{NaHCO}_3$ , 5% soro fetal bovino, 1% gamicina) e sua quantidade estimada por contagem de uma alíquota de  $100\mu\text{L}$  em câmara de Neubauer. A densidade celular utilizada nas garrafas estacionárias foi de cerca de  $60.000\text{ células/cm}^2$  (garrafas preparadas com 48 horas de antecedência com  $30.000\text{ células/cm}^2$ ), o meio de cultura utilizado foi VPSFM sem soro. As culturas foram mantidas em estufa à  $37^{\circ}\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  para a manutenção do pH do meio nas culturas em sistema aberto (placas).

### 3.2. Produção de estoques virais das quimeras

Os clones quiméricos formados foram cultivados em culturas de células Vero em garrafa estacionária, sendo esta a chamada passagem 0 (zero). Os estoques virais de trabalho foram feitos a partir da segunda passagem em células Vero das quimeras selecionadas para fazer parte da vacina tetravalente, tendo os ensaios realizados utilizando amostras na terceira passagem, portanto. Foram preparados em frascos de 175cm<sup>2</sup> em culturas de células Vero com densidade de 60.000 células/cm<sup>2</sup>. As culturas foram infectadas com m.o.i. (multiplicidade de infecção) de 0,002 e permaneceram em estufa a 37°C por 72 à 120 horas, quando o vírus era recolhido, o que coincidia com a observação do efeito citopático (CPE) moderado. O meio sobrenadante das culturas foi mantido em gelo até que fosse centrifugado a 400 g (2000 rpm) por 10 minutos para clarificação (retirada dos fragmentos de degradação celular e células em suspensão). Adicionamos sorbitol (8% volume final), para evitar a formação de cristais devido ao congelamento, e as suspensões foram aliqüotadas em 0,5 ml e armazenadas em freezer -70°C, devidamente identificadas.

As quimeras de Dengue selecionadas para o estabelecimento da técnica de PCR em tempo real (Tabela 3-1) foram inoculadas em células Vero, cada um dos vírus foi cultivado, em garrafas ventiladas de 175cm<sup>2</sup>, contendo 60.000 cél/cm<sup>2</sup>, em meio VP-SFM sem soro, suplementado com glutamina 4 mM e bicarbonato de sódio 5%. O cultivo foi mantido por 6 dias, em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após 6 dias de propagação, o sobrenadante foi recolhido. Posteriormente, uma alíquota de cada um dos 4 sorotipos foi titulada por ensaio de plaque, em placas de 6 poços.

**Tabela 3-1.** Lista das cepas virais utilizadas ao longo do projeto e o título viral das amostras utilizadas.

Cepa Viral	Título Viral da P2 (PFU/ml)
FA/DEN1 (PE)	1,8 x 10 <sup>6</sup>
FA/DEN2 (PE)	2,9 x 10 <sup>6</sup>
FA/DEN3 H87#3	3,7 x 10 <sup>8</sup>
FA/DEN4 Ven87	3,2 x 10 <sup>5</sup>

\*P2 são as amostras da segunda passagem celular em garrafa estacionária.

### 3.3. Curvas de propagação viral

Foram feitas curvas de crescimento ou cinética viral através da infecção de monocamadas de células Vero, em meio VP-SFM, em garrafas de 175cm<sup>2</sup> e no sistema de *cell factories* (figura 3-1) de 2, 4 e 10 andares. A densidade celular de 60.000 cél/cm<sup>2</sup> e o m.o.i. de 0,002 foram utilizados para todos os cultivos, sendo as garrafas estacionárias preparadas com 30.000 cél/cm<sup>2</sup> e as *cell factories* com 40.000 cél/cm<sup>2</sup>, com 48 horas de antecedência. Durante 7 dias as culturas foram mantidas em estufa com 5% CO<sup>2</sup>, a 37°C, e foram coletadas alíquotas (de quantos mL?) a cada 24 horas após a infecção. Ou seja, foram coletadas alíquotas 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias, respectivamente) após a infecção. As alíquotas coletadas ao longo da curva de crescimento foram congeladas a -70°C e submetidas a titulação por ensaio de placa em células Vero e RT-qPCR.



**Figura 3-1.** Cell factory de 10 andares. Fonte: Thermo Scientific website.

### 3.4. Titulação viral

A técnica utilizada como padrão ouro para dosagem dos títulos virais no laboratório é contagem do número de placas de lise (adaptado a partir de Dulbecco, 1952) produzidas em monocamadas de células Vero, sob meio 199/Earle completo/CMC. Para as titulações das alíquotas de cada uma das quimeras inoculadas, foram utilizadas placas de 6 poços, com células Vero semeadas a densidade de 60.000 células/cm<sup>2</sup>, 24 horas antes do uso.

Para a infecção foram feitas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) da suspensão viral e inoculação da monocamada com 0,1ml de cada diluição com incubação a 37°C a 5% de  $\text{CO}_2$  por 1 hora. Em seguida, o inóculo foi aspirado e adicionado 1mL de meio 199/Earle/CMC para uma incubação de 7 dias em estufa de 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$ . Passados os 7 dias, as monocamadas foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 0,04%. Foi feita então a contagem do número de placas de lise em cada poço e o número de unidades formadoras de placa (PFU) por ml de amostra foi calculado. Para o cálculo do título viral de cada amostra foi utilizada a seguinte fórmula:

**T =  $\log_{10}M + \log_{10}ID + \log_{10}FC$** , onde:

T = título expresso em  $\log_{10}$  PFU/mL;

M = média do n° de placas de lise contadas em uma determinada diluição;

ID= inverso da diluição onde as placas de lise foram contadas;

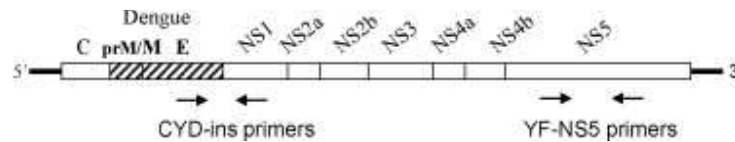
FC = fator de correção do inóculo para mL. Como o inóculo corresponde a 100  $\mu\text{L}$ , que é a décima parte de 1,0 mL,  $FC = 1$  ( $\log_{10} = 1$ ).

### 3.5. Desenho dos oligonucleotídeos

Para a padronização do RT-qPCR para Dengue o desenho e a construção dos oligonucleotídeos foi realizada através do programa *Primer Express® Software* Versão 3.0. Os iniciadores senso e reverso foram desenhados para a região do envelope de Dengue e do início da região de NS1 de Febre Amarela, respectivamente, e as sondas para a região compreendida entre os iniciadores (Figura 3-1). O fato de um iniciador ligar-se em uma região de Dengue e o outro em uma de Febre Amarela garante que a reação seja específica para os vírus quiméricos, evitando a reação cruzada, ou seja, a quantificação tanto de vírus selvagens de Febre Amarela quanto de Dengue, uma vez que só reconhece a região de junção dos dois.

Inicialmente, foram testados iniciadores e sondas utilizados em outras quimeras de Dengue e Febre Amarela (Mantel et al, 2008) (Tabela 3-2 e 3-3), porque acreditava-se que as quimeras por apresentar a mesma construção tivessem uma sequência bem. No entanto, após ensaios testando estes oligonucleotídeos e comparação das sequências, confirmamos que somente os correspondentes a quimerca de sorotipo 3 foram capazes de amplificar as quimeras desenvolvidas em Bio-Manguinhos. Após o sequenciamento, os oligonucleotídeos foram desenhados de forma a reconhecer a sequência que codifica a proteína E de Dengue e a proteína NS1 de Febre Amarela de cada quimera. As quimeras também podem ser avaliadas através de

oligonucleotídeos que reconhecem a sequência que codifica a proteína NS5 de Febre Amarela, presente nas quimeras (Mantel et al, 2008) (Tabela 3-3). Em seguida, foram utilizados os iniciadores desenhados a partir das sequências das quimeras utilizadas na proposta da vacina (Tabela 3-4).



**Figura 3-2.** Esquema da posição dos iniciadores utilizados no projeto.  
Fonte: Mantel et al, 2008.

**Tabela 3-2.** Lista dos iniciadores e sondas para a região E/NS1, publicados em Mantel et al, 2008. Foram alterados os fluoróforos para possibilitar o desenvolvimento de um RT-PCR quantitativo em tempo real multiplex.

Nome/Descrição	Sequência (5'-3')
D1-E 2416–2507 Direto	CATTGCAGTTGGCCTGGTAA
D1-E 2416–2507 Reverso	ACT TGAGCTCTCTCTTGCCAAAG
D1-E 2416–2507 Sonda (Fragmento com 92pb)	Fam-CCGATCAAGGATGCGCCATCA- NFQ-MGB
D2-E 2423–2485 Direto	GTGGGAGTCGTGACGCTGTA
D2-E 2423–2485 Reverso	GTTGATGGCGCATCCTTGATC
D2-E 2423–2485 Sonda (Fragmento com 54pb)	VIC-TGGGAGTTATGGTGGGCGCCG- NFQ-MGB
D3-E 2385–2479 Direto	AAAACACTTCCATGTCATTTTCATG
D3-E 2385–2479 Reverso	GTTGATGGCGCATCCTTGATC
D3-E 2385–2479 Sonda (Fragmento com 95pb)	NED-TGCGATAGGAATTATCACACTCTATCTGGGAGC- NFQ-MGB
D4-E 2362–2463 Direto	CT TAGTATTGTGGATTGGCACGAA
D4-E 2362–2463 Reverso	GCGCCAACTGTGAAACCTAGA
D4-E 2362–2463 Sonda (Fragmento com 102pb)	Cy5-AGAAACACTTCAATGGCAATGACGTGCAT- NFQ-MGB

**Tabela 3-3.** Lista dos iniciadores e sonda para a região NS5 de Febre Amarela publicados em Mantel et al, 2008.

Nome/Descrição	Sequência (5'-3')
YF-NS5 9595–9677 Direto	GCACGGATGTAACAGACTGAAGA
YF-NS5 9595–9677 Reverso	CCAGGCCGAACCTGTCAT
YF-NS5 9595–9677 Sonda (Fragmento com 83pb)	Fam-CGACT GTGTGGTCCGGCCCATC-Tamra

**Tabela 3-4.** Lista dos iniciadores desenhados para a região E/NS1.

Nome/Descrição	Sequência (5'-3')
D1-E+NS1 2353-2476 Direto	AATAGGGATTCTGCTGACATGGTT
D1-E+NS1 2353-2476 Reverso (Fragmento com 124pb)	GCATACCTTGATCCGCTTGA
D2-E+NS1 2383-2481 Direto	GAATTCACGTAGTACCTCACTGTCTGT
D2-E+NS1 2383-2481 Reverso (Fragmento com 99pb)	ATGGCGCATCCTTGATCAG
D3-E+NS1 2391-2469 Direto	CT TCTATGTCATTTTCATGCATTGC
D3-E+NS1 2391-2469 Reverso (Fragmento com 79pb)	CATCCTTGATCGGCTTGA
D4-E+NS1 2390-2472 Direto	TCAAGGAACACTTCAATGGCTATG
D4-E+NS1 2390-2472 Reverso (Fragmento com 83pb)	TGATCGGCGCCAACCTGT

### 3.6. Extração de RNA viral

O RNA total foi isolado a partir do sobrenadante das culturas de células inoculadas com os vírus quimera. Para tanto, foi realizada a extração do RNA das amostras de cultivos virais *in vitro* com a utilização do kit da *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN).

Este *kit* é capaz de extrair o RNA purificado de amostras de plasma, soro ou outros fluidos corporais, além de culturas celulares. As amostras podem ser frescas ou congeladas, mas o ideal é que não se descongele mais de uma vez, podendo haver diminuição da sensibilidade.

Inicialmente, a amostra é lisada sob condições altamente desnaturantes para que RNases sejam inativadas e o RNA viral isolado esteja intacto. Então, o pH da solução é ajustado para promover a ligação do RNA na membrana de sílica-gel. O RNA permanece ligado à membrana e os contaminantes são lavados e descartados através do uso de dois diferentes tampões de lavagem. O RNA purificado é, finalmente, eluído em um tampão livre de RNases especial, pronto para uso ou estocagem. Este RNA é livre de proteínas, nucleases e outros contaminantes e inibidores.

O RNA total foi utilizado como amostras para as reações de etapa única de PCR-qRT e também para síntese dos fragmentos de cDNA que foram utilizados nas reações em duas etapas.

### 3.7. Curva padrão

Foram feitas curvas padrão de RNA viral de cada quimera para as reações de etapa única e, para as reações em duas etapas, foi utilizada uma curva padrão plasmidial do trecho da região NS5 amplificado pelos iniciadores utilizados nas reações. Esta curva padrão plasmidial foi

sintetizada a partir do vírus FA17D e com os mesmos iniciadores publicados por Mantel (2008) utilizados nas reações. Ambas as curvas consistiam em uma diluição seriada com concentrações variando em 10 cópias/reação ( $10^2$  a  $10^8$ ).

Para a diluição das curvas padrão de RNA dos 4 sorotipos, foi feita, primeiramente, a quantificação do RNA total extraído a partir do estoque viral através da reação em duas etapas utilizando os iniciadores da região NS5 e a sonda *TaqMan*<sup>®</sup>. Esta técnica foi estabelecida no laboratório e foi validada previamente. A partir do número de cópias/reação quantificado na reação em duas etapas RNA total foi, então, feita a diluição da curva.

### 3.8. Otimização da concentração dos oligonucleotídeos da RT-qPCR

#### 3.8.1. RT-qPCR sistema *TaqMan*<sup>®</sup> em duas etapas

Com o objetivo de definir a melhor concentração dos iniciadores (Tabela 4-2) para a reação de RT-qPCR em duas etapas utilizando o sistema *TaqMan*<sup>®</sup>, foram combinadas três concentrações distintas de cada iniciador (direto e reverso) formando nove pares com concentrações diferentes (Tabela 3-5). Foi utilizada uma curva padrão de RNA diluída de forma seriada nas concentrações de  $10^8$  a  $10^2$  cópias/reação como amostra e a concentração da sonda *TaqMan*<sup>®</sup> foi fixada em 200 nM. As amostras (de cada concentração) foi aplicada na placa em triplicata.

**Tabela 3-5.** Esquema com a variação da concentração dos iniciadores em nanoMolar (nM).

Iniciador reverso	Iniciador senso		
	100	300	600
100	100/100	100/300	100/600
300	300/100	300/300	300/600
600	600/100	600/300	600/600

Uma vez estabelecida a concentração ideal do par de iniciadores, foi determinada a concentração de sonda para emissão de sinal fluorescente com o menor valor de  $C_T$ . Para este ensaio foram empregadas seis concentrações distintas de sonda *TaqMan*<sup>®</sup>, variando de 150 a 450 nM (Tabela 3-6). Cada amostra com a concentração de sonda específica foi aplicada na placa em triplicata. Também foi utilizada a curva padrão para a realização destes ensaios. A análise dos dados revelou a melhor concentração de sonda a ser utilizada nas RT-qPCR.

**Tabela 3-6.** Condições da mistura dos reagentes para o ensaio de otimização da concentração da sonda *TaqMan*<sup>®</sup> para as reações em duas etapas, utilizando o *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*<sup>™</sup>)

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
Master Mix	5	1x
Oligo ( + )	1	600 nM
Oligo ( - )	1	600 nM
Sonda <i>TaqMan</i> <sup>®</sup>	0,38 – 1,15	150 - 450 nM
H2O	6,85 - 7,62	----
Volume mix/reação	15	----
amostra/reação	5	----
Volume final/reação	20	----

### 3.8.2. RT-qPCR sistema *SYBR Green*<sup>®</sup> etapa única

Para este grupo de ensaios, foi utilizado o segundo conjunto de iniciadores, desenhado especificamente para as quimeras do projeto.

Com o objetivo de definir a melhor a concentração dos iniciadores (Tabela 3-4) para a reação de RT-qPCR em etapa única utilizando o sistema *SYBR Green*<sup>®</sup>, foram testadas nove concentrações distintas para os iniciadores (direto e reverso), ambos na mesma concentração. Foram elas: 80nM, 120nM, 160nM, 200nM e 240nM (Tabela 3-7). Foi utilizada uma curva padrão de RNA diluída de forma seriada nas concentrações de  $10^8$  a  $10^2$  cópias/reação como amostra e a concentração da sonda *TaqMan*<sup>®</sup> foi fixada em 200nM. Cada amostra (de cada concentração) foi aplicada na placa em triplicata.

**Tabela 3-7.** Condições de mistura de reagentes para realização do ensaio de RT-qPCR usando o sistema *SYBR*<sup>®</sup> *Green*.

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
SuperMix (Express syber greenER com ROX)	10	1x
Oligo ( + )	0,2 – 0,6	80 nM – 240 nM
Oligo ( - )	0,2 – 0,6	80 nM – 240 nM
Enzima SuperScript III Platinum SYBR Green	0,5	1x
H2O	3,3 – 4,1	----
Volume mix/reação	15	----
amostra/reação	5	----
Volume final/reação	20	----



### 3.9. RT-qPCR

As reações de PCR em tempo real foram feitas no *7500 Real Time Pcr System (Applied Biosystems™)*. Foram realizadas reações de etapa única pelos sistemas de *SYBR® Green* e *TaqMan®*. O processo de padronização da PCR seguirá os passos descritos abaixo, para cada um dos sorotipos de Dengue.

#### 3.9.1. RT-qPCR sistema *TaqMan®* etapa única

Para as reações em etapa única utilizando o sistema *TaqMan®* foi utilizado o kit *TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix*, da *Applied Biosystems™*. As condições das reações em etapa única, pré-estabelecidas, foram as demonstradas nas tabelas abaixo (Tabelas 3-8 e 3-9).

**Tabela 3-8.** Concentração dos reagentes do ensaio usando o sistema *TaqMan®* etapa única de RT-qPCR utilizando o *TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix*, da *Applied Biosystems™*.

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
Master Mix	5	1x
Oligo ( + )	1	400 nM
Oligo ( - )	1	400 nM
Sonda <i>TaqMan®</i>	0,38	150 nM
H2O	7,62	----
Volume mix/reação	15	----
amostra/reação	5	----
Volume final/reação	20	----

**Tabela 3-9.** Condições de ciclagem térmica do ensaio usando o sistema *TaqMan®* etapa única de RT-qPCR, utilizando o *TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix*, da *Applied Biosystems™*.

Ciclagem térmica			
	Hold	50°C	5'
	Hold	95°C	20"
40 ciclos	Desnaturação	Ciclo	95°C 15"
	Anelamento e extensão		60°C 60"

#### 3.9.2. RT-qPCR sistema *SYBR® Green* etapa única

Para estas reações, foram utilizados o *EXPRESS SuperScript® Mix for One-Step GreenER™* e o *EXPRESS SYBR® GreenER™ SuperMix with Premixed ROX*, da *Invitrogen™*. As

condições para as reações com *SYBR Green*<sup>®</sup> foram as relacionadas nas tabelas abaixo (Tabelas 3-10 e 3-11).

**Tabela 3-10.** Concentração dos reagentes do ensaio usando o sistema *SYBR*<sup>®</sup> *Green* de RT-qPCR

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
SuperMix (Express syber greenER com ROX)	10	1x
Oligo ( + )	0,5 – 0,6	200 – 240 nM
Oligo ( - )	0,5 – 0,6	200 – 240 nM
Enzima SuperScript III Platinum SYBR Green	0,5	1x
H2O	3,9 – 4,1	----
Volume mix/reação	15	----
amostra/reação	5	----
Volume final/reação	20	----

**Tabela 3-11.** Condições de ciclagem térmica do ensaio usando o sistema *SYBR*<sup>®</sup> *Green* de RT-qPCR

Ciclagem térmica			
		Hold	50°C 5'
		Hold	95°C 2'
40 ciclos	Desnaturação	Ciclo	94°C 15''
	Anelamento e extensão		60°C 60''
			95°C 15''
Curva de Dissociação			60°C 60''
			95°C 30''
			60°C 15''

### 3.9.3. RT-qPCR sistema *TaqMan*<sup>®</sup> duas etapas

#### 3.9.3.1. Síntese da cadeia de DNA complementar

Para as RT-qPCR em duas etapas, após a extração do RNA, a síntese da cadeia de DNA complementar (cDNA) ao RNA de cada sorotipo viral foi realizada usando *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems™)* e quantificada por nanodrop. Todas as reações de síntese de cDNA foram realizadas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems™)*, com ciclagem de 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. As outras condições de reação estão listadas na Tabela 3-12.

**Tabela 3-12.** Condições para a reação de síntese de cDNA.

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
Água milli-Q	7	----
Random Primer 10x	4	1 x
Tampão 10 x	4	1 x
dNTP	2	100 mM
Inibidor de RNase 40U/ µL	1	1.0U
MultiScribe 50U/µL	2	2.5U
Total mix/reação	20	-----
RNA/reação	20	-----
Volume final cDNA	40	-----

### 3.9.3.2. Reações

Nas reações em duas etapas foram utilizados os oligonucleotídeos publicados por Mantel e colaboradores (2008) correspondentes à região NS5 de Febre Amarela e à região de junção E/NS1 do vírus quimérico do sorotipo 3 e a técnica de RT-qPCR utilizando os mesmos iniciadores já se encontrava em processo de validação em Bio-manguinhos ou LATEV. Foram utilizadas as mesmas condições de reação em uso na rotina do laboratório para as reações que tinham como alvo a região NS5 (Tabelas 3-13 e 3-14) e avaliadas as melhores condições para as reações com o sorotipo 3 como alvo Tabelas (3-14 e 3-15). As reações de segunda etapa foram realizadas utilizando o *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*<sup>™</sup>).

**Tabela 3-13.** Concentração dos reagentes do ensaio usando o sistema *TaqMan*<sup>®</sup> em duas etapas tendo como alvo a região NS5 de Febre Amarela..

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
Master Mix	12,5	1x
Oligo ( + )	0,75	300 nM
Oligo ( - )	0,75	300 nM
Sonda <i>TaqMan</i> <sup>®</sup>	0,38	150 nM
H2O	5,62	----
Volume mix/reação	20	----
amostra/reação	5	----
Volume final/reação	25	----

**Tabela 3-14.** Condições de ciclagem térmica do ensaio usando o sistema *TaqMan*<sup>®</sup> duas etapas de RT-qPCR.

Ciclagem térmica			
		Hold	50°C 2'
		Hold	95°C 10'
40 ciclos	Desnaturação	Ciclo	94°C 15''
	Anelamento e extensão		60°C 60''

**Tabela 3-15.** Concentração dos reagentes do ensaio usando o sistema *TaqMan*® em duas etapas tendo a região E/NS1 de junção como alvo.

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
Master Mix	12,5	1x
Oligo ( + )	1,5	600 nM
Oligo ( - )	1,5	600 nM
Sonda <i>TaqMan</i> ®	0,5	200 nM
H2O	4	----
Volume mix/reação	20	----
amostra/reação	5	----
Volume final/reação	25	----

### 3.10. Correlação entre PFU/mL e cópias/mL

Com o objetivo de estabelecer uma correlação entre o número de PFU/mL e de cópias/mL, analisamos a quantificação de amostras de vírus recombinantes de FA 17D e Dengue propagados *in vitro* por RT-qPCR e ensaio de placas de lise. As amostras utilizadas nesta correlação foram de garrafas estacionárias ou sistema de *cell factories*, que são sistemas projetados para a cultura de células em larga escala e produção de biomateriais, como vacinas e anticorpos monoclonais, já que fornecem uma extensa superfície de contato para o crescimento celular em um espaço limitado. Tanto para a cinética em garrafas estacionárias quanto em *cell factories* foram coletadas alíquotas a cada 24 horas, durante 7 dias.

### 3.11. Análise estatística

O desvio padrão (DP) é uma medida de dispersão absoluta que descreve os desvios dos resultados em relação à média. O coeficiente de variação (CV) é uma medida de dispersão relativa, que corresponde ao desvio padrão expresso como a porcentagem da média. Quanto menor o CV, mais homogêneo é o conjunto de dados. A variância é o quadrado do desvio padrão e, assim como este, é uma medida de dispersão de uma variável.

A Análise de Variância (ANOVA) é um procedimento utilizado para comparar três ou mais tratamentos. A ANOVA simples testa a hipótese nula de que todas as populações analisadas têm médias idênticas contra a hipótese alternativa de que uma ou mais médias das populações difere das demais. Para fazer a ANOVA comparando variâncias de diferentes populações, utiliza-se o teste F, que permite que em situações que apresentam diferença significativa, por meio do teste F, é possível avaliar a magnitude da diferença. Para tanto, é utilizado um teste de

comparações múltiplas. Optamos por utilizar nas análises do projeto o teste de Tukey, que permite testar contraste entre médias. Este teste se baseia da Diferença Mínima Significativa (DMS). Como o teste de Tukey é de certa forma independente do teste F, é possível que mesmo que o valor calculado em F sendo significativo, o a diferença encontrada no teste de Tukey não seja. Se o contraste observado for maior do que a DMS, então as médias se diferem ao nível  $\alpha$  (0,05) de significância.

O teste  $t$  de Student é um dos testes mais usados para comparar dois grupos de amostras independentes entre si. Este teste utiliza a diferença entre as médias amostrais dos dois grupos e o erro padrão da diferença das médias entre os dois grupos. Para que se realize o teste, não são necessários os dados brutos. É possível realizá-lo com base somente nas médias, desvios padrão e tamanho de cada amostra (Toledo e Ovalle, 1995).

Ambas as análises consistem em avaliar a significância da diferença entre as médias de diferentes populações, e são aplicáveis a dados contínuos e de distribuição Gaussiana. Utilizamos o teste  $t$  para fazer comparações entre 2 populações e a ANOVA simples para análise entre 3 populações. As análises utilizaram sempre um intervalo de confiança (IC) de 95%. Os dados foram previamente organizados em *Microsoft Excel 2010* e as análises foram realizadas no programa *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 5.01 a fim de avaliar os dados obtidos ao longo do projeto.

Para fazer uma análise estatística final, fizemos uma análise de correlação entre os resultados obtidos através da quantificação por RT-qPCR utilizando os parâmetros padronizados para SYBR Green e os resultados da titulação feita pelo ensaio de formação de placas de lise, a fim de verificar se existia uma correlação significativa entre eles.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de RT-qPCR padronizada ao longo deste projeto é de extrema importância para a continuidade do projeto de Vacina Recombinante contra Dengue desenvolvido no LATEV. O método fornece resultados em até 2 dias contra os 7 dias requeridos pelo método padrão ouro de titulação em placa de lise, pode ser aplicado em todas as fases de desenvolvimento da vacina como produção dos antígenos, o monitoramento da propagação viral, avaliação dos lotes vacinais, análise de amostras clínicas em estudos de dose resposta e carga viral em casos de possíveis reações adversas que venham a ocorrer.

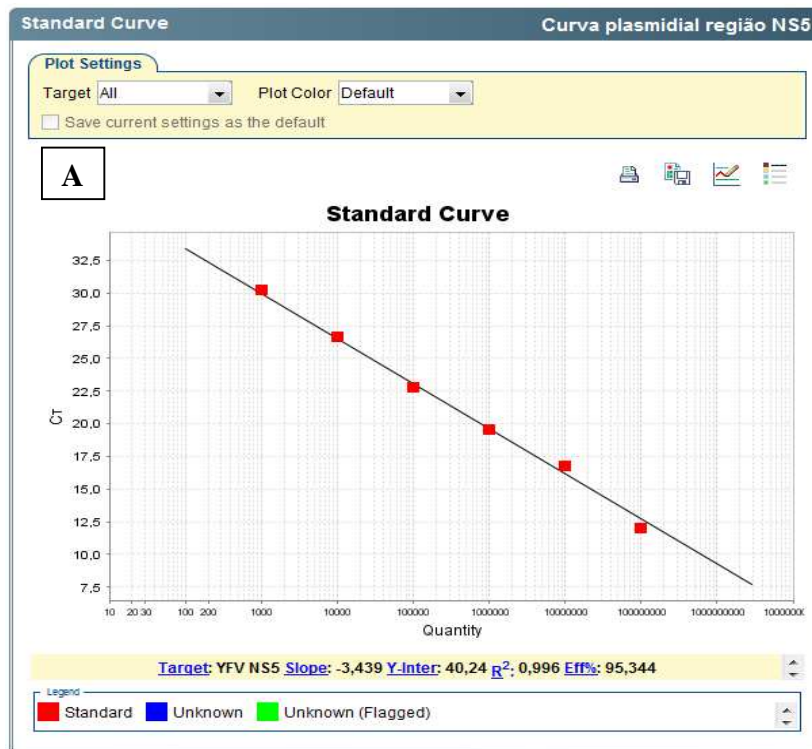
### 4.1. Curva padrão

Em projetos que têm como objetivo padronizar um método de quantificação absoluta, é necessário utilizar uma amostra padrão que corresponda ao material a ser analisado (Mantel et al, 2008). Por isso, foram feitas curvas padrão de RNA de cada sorotipo para serem utilizadas nos ensaios ao longo da padronização do teste.

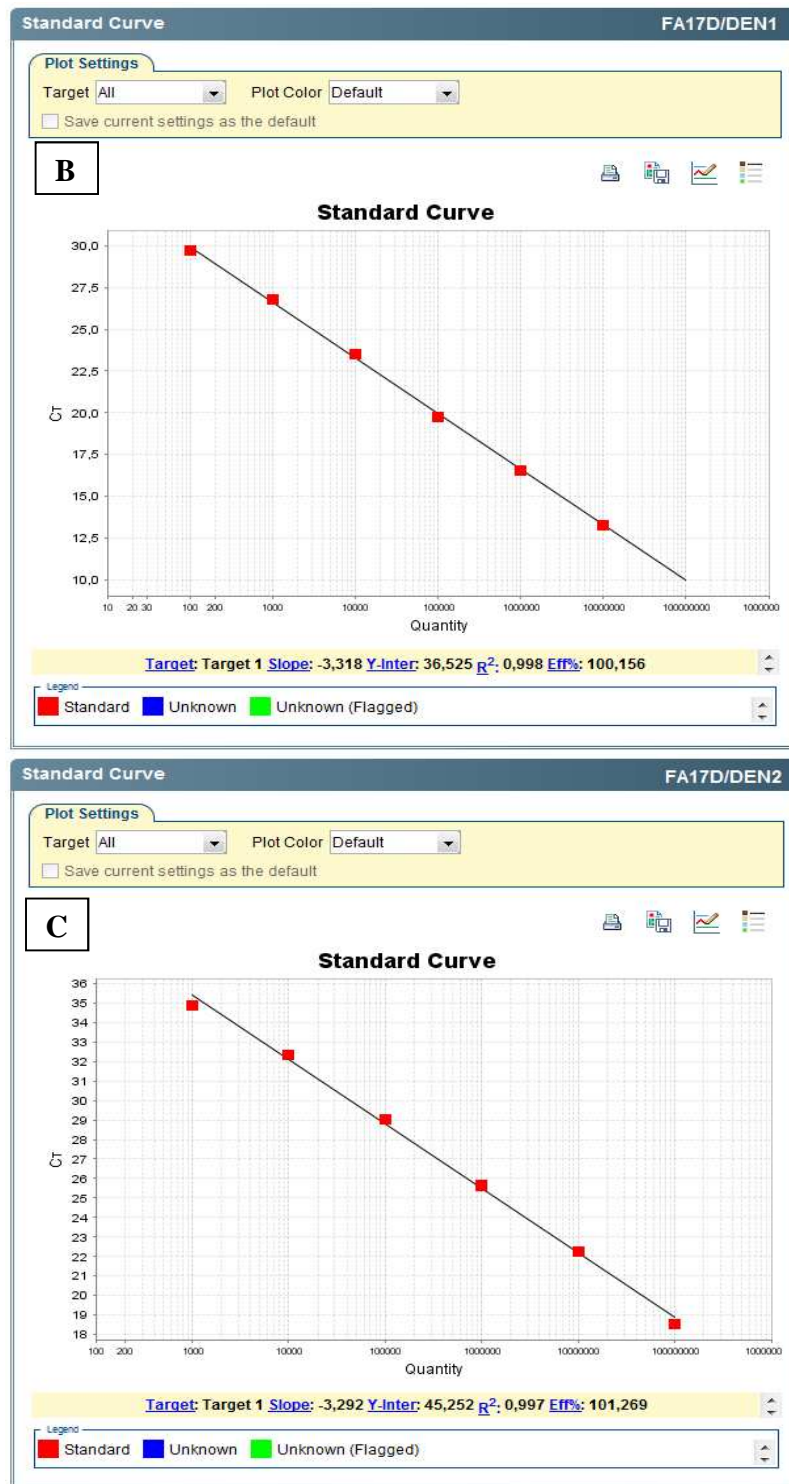
Para construir curvas padrão que nos permitissem acompanhar a cinética viral *in vitro*, dos quatro sorotipos de Dengue, amostras virais de quimeras FA17D/Dengue dos quatro sorotipos com concentração inicial de  $10^8$  cópias de RNA foram diluídas seriadamente na base 10, até o ponto  $10^2$  (Figura 4-1, 4-2 e 4-3). A quantificação do estoque viral utilizado para montar as curvas de RNA para cada sorotipo foi realizada através de um ensaio em duas etapas com os iniciadores da região NS5 do vírus da Febre Amarela, utilizando o sistema *TaqMan*<sup>®</sup> e tendo uma curva padrão plasmidial já padronizada e validada no laboratório como referência.

Em todas as curvas, as amostras referentes a cada ponto de diluição foram aplicadas em triplicata na placa e, após a reação, os parâmetros *Slope*,  $R^2$  e Eficiência, foram analisados e avaliados. A curva padrão plasmidial construída com a região NS5, utilizada nos ensaios em duas etapas utilizando o sistema *TaqMan*<sup>®</sup>, apresentou *slope* de -3,43,  $R^2$  de 0,99 e Eff%

(Eficiência) de 95,34. As curvas padrão de RNA das quimeras FA17D/DEN1, FA17D/DEN2, FA17D/DEN3 e FA17D/DEN4 apresentaram, respectivamente, *slope* de -3,31, -3,29, -3,23 e -3,31,  $R^2$  de 0,99, e Eff% (Eficiência) de 100,15, 101,26, 103,82 e 100,12. Os dados encontrados estão todos dentro do critério de aceitação da *Applied Biosystems*, no qual uma curva padrão deve ter os valores de *Slope* em torno de -3,33 (-3,8 a -3,1),  $R^2$  em torno de 0,99 (maior que 0,90) e Eff% de 100% (entre 90% e 115%), permitindo, portanto a utilização dessas curvas em todos os ensaios de quantificação viral das quimeras de Dengue.

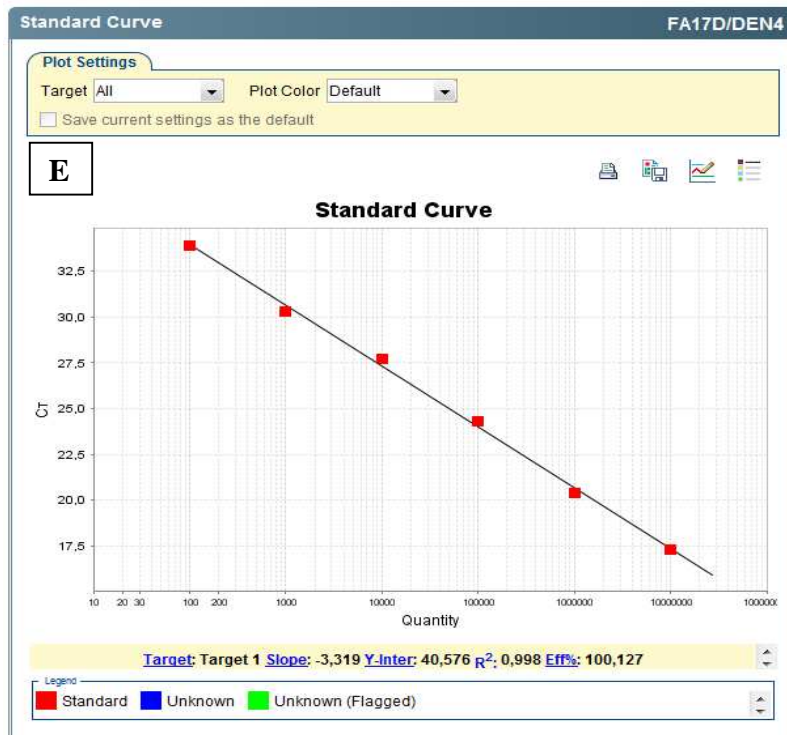
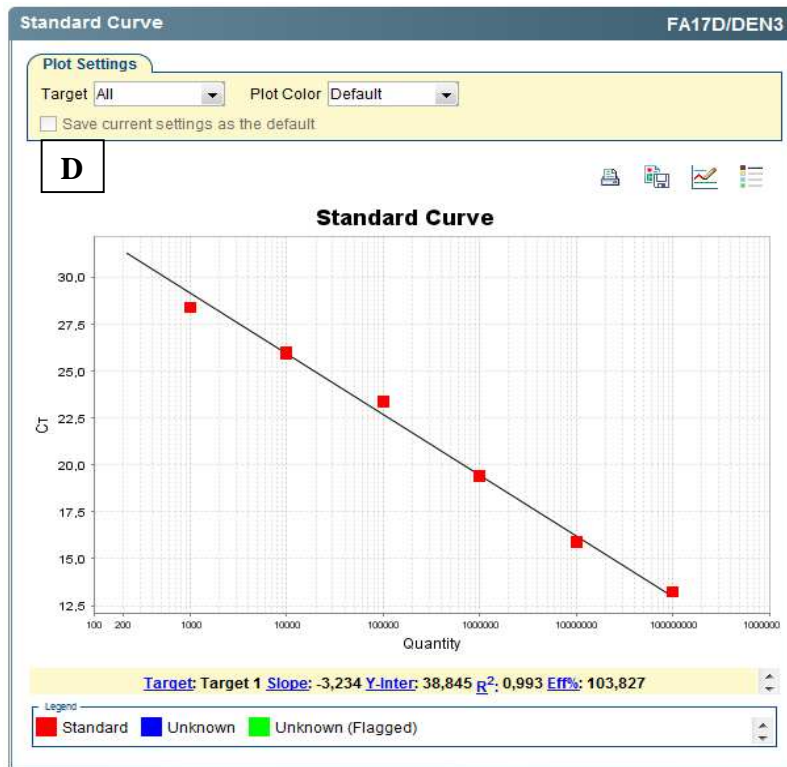


**Figura 4-1.** A - Curva padrão plasmidial da região NS5 (YFV), com 6 pontos de diluição.



**Figura 4-2.** B e C - Curvas padrão de RNA dos sorotipos FA17D/DEN1 e FA17D/DEN2, respectivamente, ambas com 6 pontos de diluição.





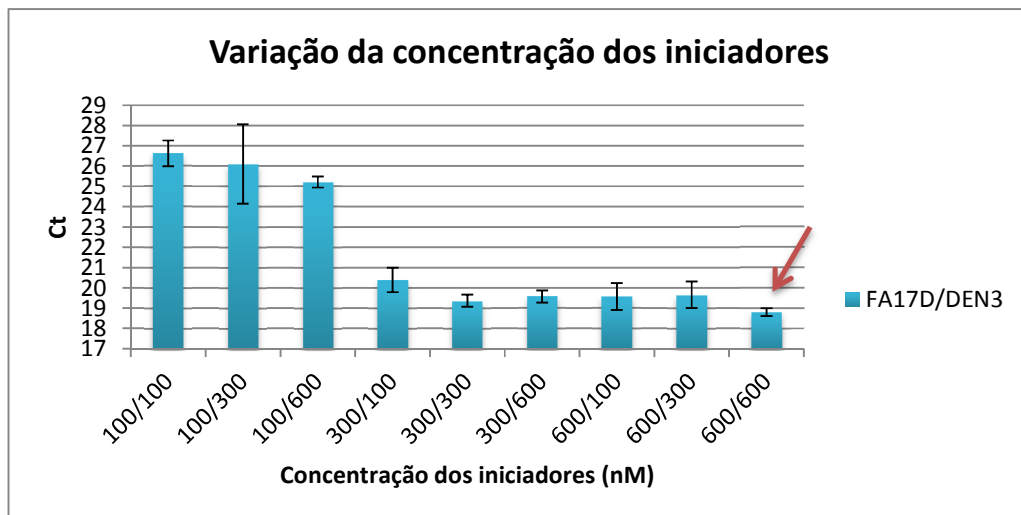
**Figura 4-3.** D e E - Curvas padrão de RNA dos sorotipos FA17D/DEN3 e FA17D/DEN4, respectivamente, ambas com 6 pontos de diluição.

## 4.2. Otimização das concentrações dos oligonucleotídeos

### 4.2.1. TaqMan®

Após o estabelecimento das curvas padrão para as quatro quimeras, a quimera de Dengue 3 foi o primeiro alvo utilizado na padronização do PCR em tempo real. Inicialmente para o desenvolvimento e padronização da técnica foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores descritos por Mantel e colaboradores (2008) para acompanhamento da cinética de replicação viral através da avaliação das regiões E/NS1 e NS5. Os oligonucleotídeos desenhados para a junção da região E correspondente a sequência da proteína E de Dengue 3 e da região NS1 correspondente a proteína NS1 de Febre Amarela, nos permite acompanhar exclusivamente a quimera de FA17D/DEN3, no entanto os iniciadores desenhados para a região NS5 correspondente a proteína do vírus da Febre Amarela nos possibilitou o acompanhamento da cinética tanto da quimera FA17D/DEN3 quanto do vírus de Febre Amarela.

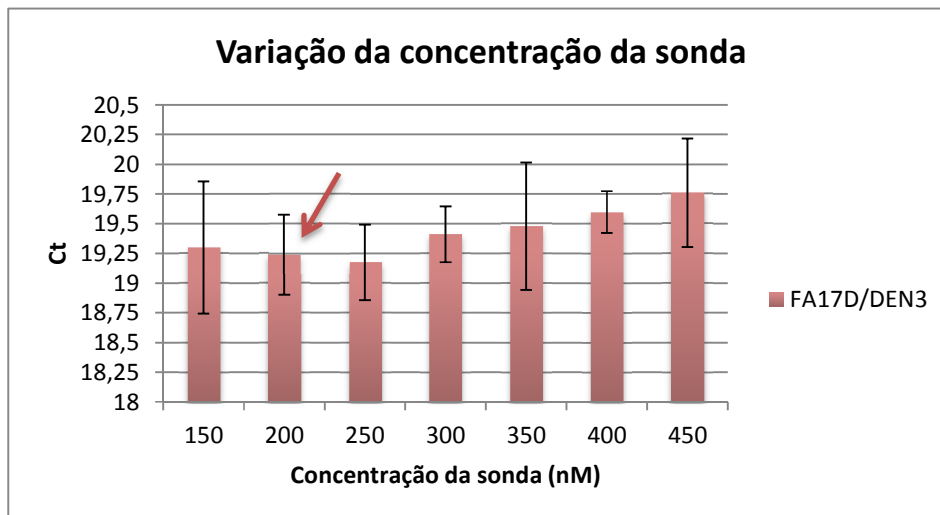
Para definir a melhor concentração de oligonucleotídeos para a região E/NS1 a ser usada nos experimentos, nove concentrações distintas foram testadas, mantendo a concentração da sonda fixa em 200 nM (Figura 4-4). Após a análise dos dados a concentração de 600 nM foi a escolhida por apresentar a menor variação entre resultados e o melhor desempenho na quantificação, ou seja, menor  $C_T$  e menor desvio padrão.



**Figura 4-4.** Variação da concentração dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de TaqMan® em duas etapas. Valores encontrados para uma mesma amostra de estoque viral FA17D/DEN3 e seus respectivos desvios padrão.

Uma vez definida a melhor concentração de oligonucleotídeos iniciadores, sete concentrações de sonda foram avaliadas. A concentração dos oligonucleotídeos iniciadores foi

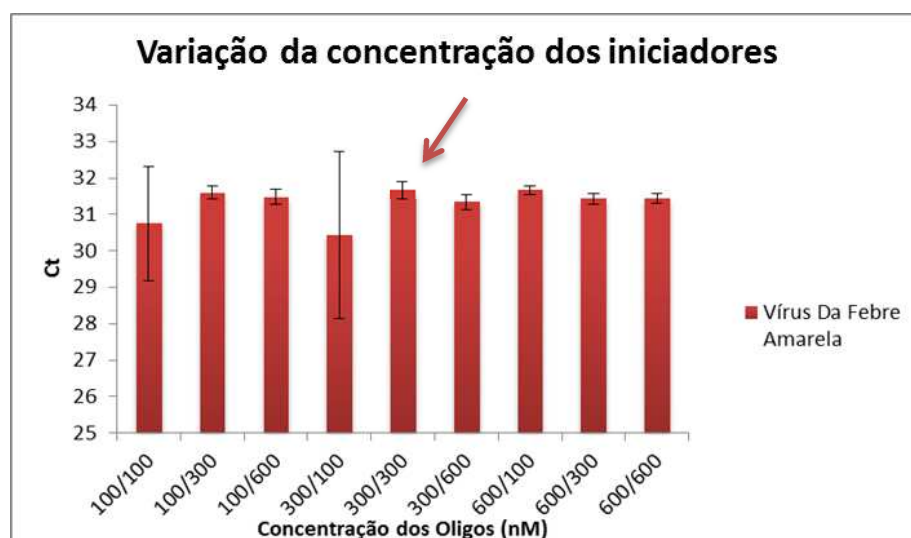
fixada em 600/600 nM. A menor concentração de sonda que apresentou o menor desvio padrão e também o menor valor de  $C_T$  foi 200 nM (Figura 4-5).



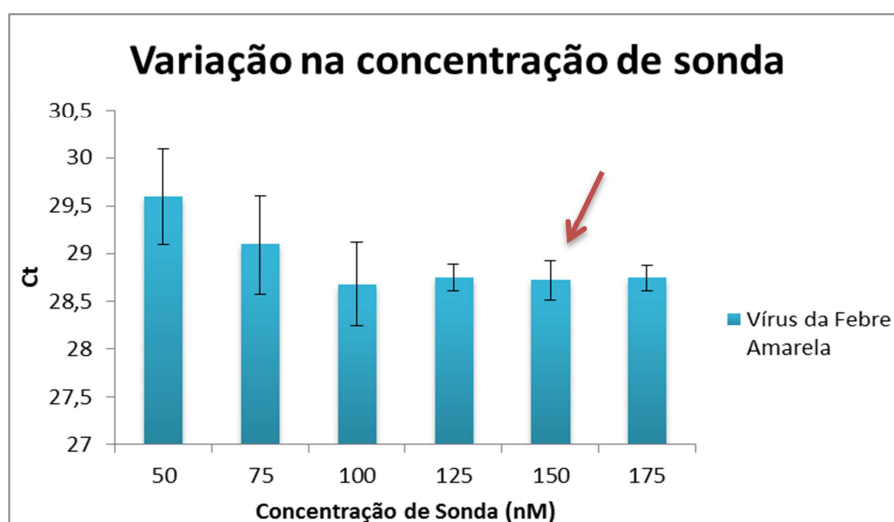
**Figura 4-5.** Variação da concentração da sonda utilizada nas reações de TaqMan® em duas etapas. Valores encontrados para uma mesma amostra de estoque viral FA17D/DEN3 e seus respectivos desvios padrão.

Para avaliação da região NS5 foram utilizadas concentrações previamente estabelecidas em outro projeto do laboratório, mas escolhidas através do mesmo procedimento (Fernandes, A. G., 2012). Os resultados obtidos na variação da concentração dos iniciadores de 100 a 600 nM, com concentração de sonda fixa em 150 nM, pode ser observada na Figura 4-6. A concentração escolhida foi a de 300/300 nM. Os resultados obtidos nos ensaios avaliando a quantificação com variação da sonda *TaqMan*® e fixando a concentração dos oligonucleotídeos iniciadores em 300/300 nM estão representados na Figura 4-7. A concentração de sonda escolhida foi a de 125 nM.

Para as quimeras FA17D/DEN1, FA17D/DEN2 e FA17D/DEN4 não foi possível realizar o mesmo procedimento com os oligonucleotídeos publicados por Mantel e colaboradores (2008) porque não conseguimos amplificar as quimeras do projeto com os oligonucleotídeos desenhados para região E/NS1. No entanto, todos foram amplificados pelos oligonucleotídeos correspondentes à região NS5 de Febre Amarela e as concentrações utilizadas foram as mesmas, assim como os padrões de amplificação.



**Figura 4-6.** Variação das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores, valores de  $C_T$  encontrados para a mesma concentração de vírus ( $10^4$  cópias/ mL) e seus respectivos desvios padrão. Fonte: Fernandes, A. G., 2012.



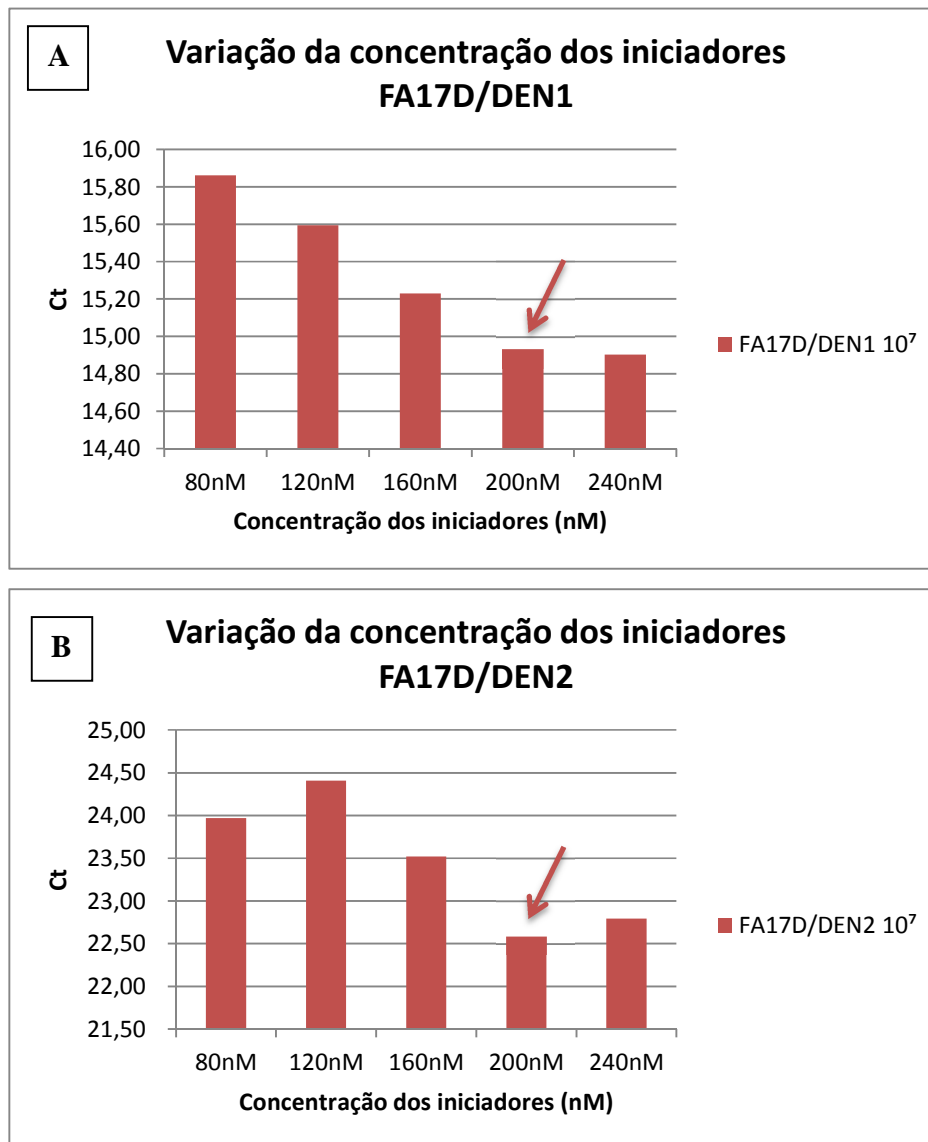
**Figura 4-7.** Variação da concentração da sonda, valores de  $C_T$  encontrados para a mesma concentração de vírus ( $10^4$  cópias/ mL) e seus respectivos desvios padrão. Fonte: Fernandes, A. G., 2012.

#### 4.2.2 SYBR<sup>®</sup> Green etapa única

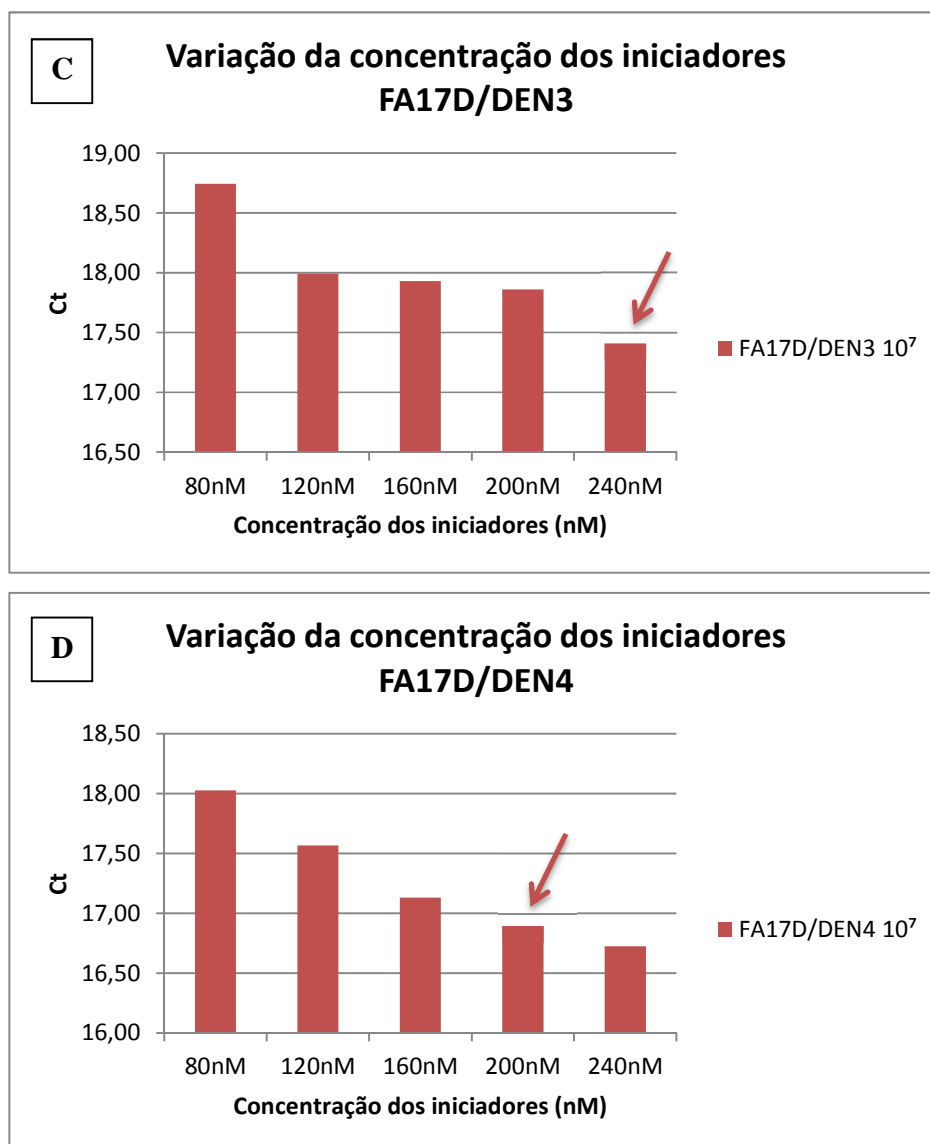
Após a padronização dos ensaios utilizando *TaqMan*<sup>®</sup>, e como não foi possível a amplificação de todos os sorotipos com o primeiro conjunto de oligonucleotídeos testados, novos oligonucleotídeos foram desenhados e testados com *SYBR*<sup>®</sup> Green, uma vez que não tínhamos tido acesso, ainda, às sondas.

Para as reações com *SYBR*<sup>®</sup> Green também foi feita uma análise para encontrar a melhor concentração de iniciadores para a realização dos ensaios. Dentre as concentrações testadas, a

que apresentou maior linearidade e menor  $C_T$  foi 240nM para o sorotipo 3 e 200nM para os outros sorotipos (Figuras 4-8 e 4-9).



**Figura 4-8.** Variação das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores, valores de  $C_T$  encontrados para a mesma concentração de vírus ( $10^7$  cópias/ mL) para os sorotipos de vírus quiméricos FA17D/DEN1 (A) e FA17D/DEN2 (B).



**Figura 4-9.** Variação das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores, valores de CT encontrados para a mesma concentração de vírus (10<sup>7</sup> cópias/ mL) para os sorotipos de vírus quiméricos FA17D/DEN3 (C) e FA17D/DEN4 (D).

A tabela 4-1 relaciona, para cada sorotipo, o valor da T<sub>m</sub>, o limite de quantificação e a média do C<sub>T</sub> 10<sup>7</sup>. Como é possível observar na tabela, os ensaios utilizando o sistema de *SYBR*<sup>®</sup> *Green* não permitiram a quantificação de amostras com concentrações mais baixas, exceto para o sorotipo 4. Enquanto isso, os ensaios em duas etapas utilizando o sistema *TaqMan*<sup>®</sup> nos permitiram quantificar amostras com concentrações de 10<sup>2</sup> cópias de RNA por reação para todos os 4 sorotipos das quimeras.

**Tabela 4-1.** Determinação dos limites de quantificação (LQ) das reações com o sorotipo *SYBR<sup>®</sup> Green*, T<sub>m</sub> e C<sub>T</sub> médio para os 4 sorotipos de quimeras, comparando com o observado nas reações em duas etapas com *TaqMan<sup>®</sup>*.

Número de cópias	Média C <sub>T</sub> 10 <sup>7</sup> *	T <sub>m</sub> (°C)**	LQ <i>SYBR<sup>®</sup> Green</i>	LQ <i>TaqMan<sup>®</sup></i>
FA17D/DEN1	14,94	81	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
FA17D/DEN2	22,59	82,5	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>
FA17D/DEN3	17,41	77,5	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>
FA17D/DEN4	16,90	80,5	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>

\*C<sub>T</sub> médio observado nos ensaios de *SYBR<sup>®</sup> Green* para os pontos da curva padrão com concentração viral de 10<sup>7</sup> cópias/mL dos quatro sorotipos, respectivamente.

\*\*T<sub>m</sub> (Temperatura de dissociação) de cada sorotipo nas reações de *SYBR<sup>®</sup> Green*.

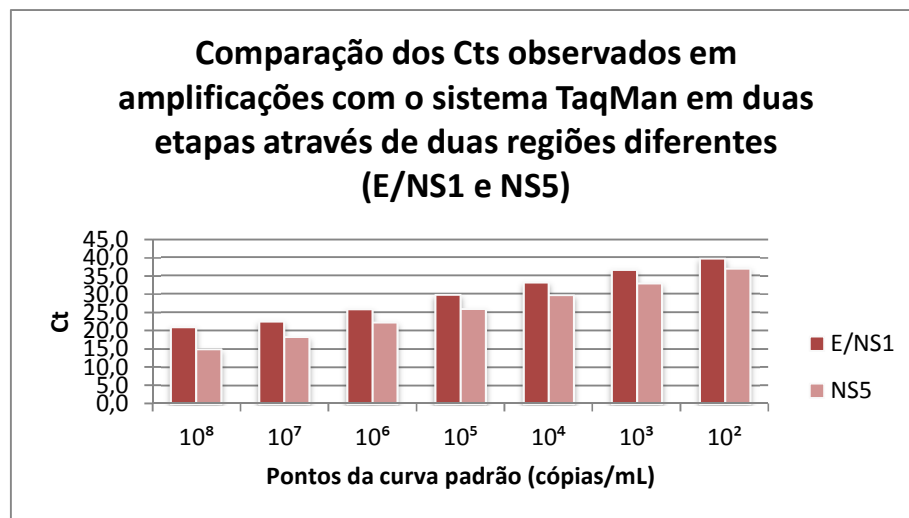
Com a padronização da técnica a faixa de concentração de oligonucleotídeos iniciadores e sonda que promoveram o melhor resultado e a melhor proporção entre eles, seguindo um modelo de custo-benefício foram estabelecidos de forma a garantir maior eficiência na quantificação, com menor C<sub>T</sub> e menor variação entre as replicatas. Para as reações em duas etapas com *TaqMan<sup>®</sup>*, para o sorotipo FA17D/DEN3, as concentrações selecionadas foram 600nM para os iniciadores, senso e anti-senso (senso e reverso), e 200nM para a sonda. Já para os ensaios com *SYBR Green<sup>®</sup>*, em etapa única, foram padronizados com 200nM de oligonucleotídeos iniciadores para os sorotipos 1, 2 e 4, e 240 nM para o sorotipo 3.

Encontrar a concentração ideal de oligonucleotídeos iniciadores é crucial para a otimização de uma RT-qPCR. É recomendado (*Applied Biosystems<sup>™</sup>*) que a solução de trabalho seja mantida em uma concentração de 10-100 μM e que seja pipetado sempre um volume maior que 5 μL desta solução. Estas recomendações foram seguidas nas reações realizadas no projeto.

A concentração de oligonucleotídeos utilizada nas PCR pode variar muito, com concentrações de 100 a 900 nM (Bae et al, 2003; Gomes-Ruiz et al, 2006; Lai et al, 2007; Gurukumar et al, 2009; Nunes et al, 2011; Kumar et al, 2012). A concentração ótima de oligonucleotídeos iniciadores utilizados em RT-qPCR com *SYBR Green<sup>®</sup>* e *TaqMan<sup>®</sup>* tendem a ser igual (Gomes-Ruiz et al, 2006; Kumar et al, 2012), no entanto, isso não foi observado neste projeto. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de os oligonucleotídeos correspondentes à região E/NS1 de Dengue usados nas reações com *TaqMan<sup>®</sup>* não terem sido os mesmos utilizados nas reações com *SYBR Green<sup>®</sup>*.

#### 4.3. Comparação entre ensaios de duas etapas com sistema *TaqMan*<sup>®</sup> e o vírus FA17D/DEN3 avaliando duas regiões diferentes

Com as concentrações dos reagentes otimizada, e a fim de dar início ao processo de padronização da técnica de RT-qPCR para a quantificação dos vírus quiméricos de Dengue, utilizamos o sistema *TaqMan*<sup>®</sup>, em reações de duas etapas com os oligonucleotídeos publicados por Mantel e colaboradores (2008), tanto correspondentes à região de junção E/NS1 quanto à região NS5 de Febre Amarela. Nesta etapa todas as reações foram feitas utilizando a quimera FA17D/DEN3 como amostra. Com os resultados obtidos com as quantificações realizadas com os dois sistemas, foi realizada uma comparação entre os valores de  $C_T$  encontrados para as mesmas amostras avaliadas pelas diferentes regiões: E/NS1 e NS5 (Figura 4-10).

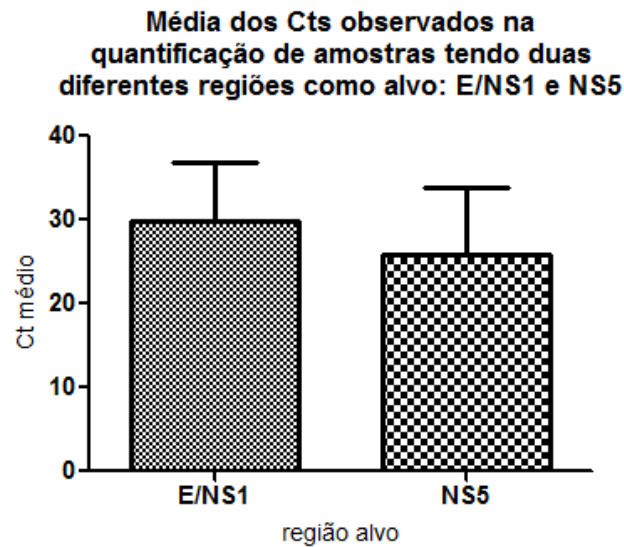


**Figura 4-10.** Comparação entre CTs observados através da amplificação dos pontos de uma curva padrão de cDNA FA17D/DEN3 por duas regiões diferentes do vírus – E/NS1 e NS5 – utilizando o sistema *TaqMan*<sup>®</sup> em reações de duas etapas.

Através desta comparação foi possível observar que os ensaios que têm a região NS5 como alvo são mais sensíveis, apresentando  $C_{Ts}$  mais baixos (em torno de 4 a 5  $C_{Ts}$  de diferença) para todas as amostras, quando comparados aos ensaios que possuem a região E/NS1 como alvo, tendo essa diferença, sido estatisticamente significativa (Figura 4-11) e avaliada através da realização de um teste t, observamos um p valor < 0,0001 e um  $R^2$  de 0,94.

No entanto, a diferença entre os ensaios não se limita à região alvo, mas também ao tipo de oligonucleotídeo marcado utilizado.





**Figura 4-11.** Comparação entre as médias dos CTs observados através da amplificação dos pontos de uma curva padrão de cDNA FA17D/DEN3 por duas regiões diferentes do vírus – E/NS1 e NS5 – utilizando o sistema TaqMan® em reações de duas etapas.

A sonda *TaqMan*® utilizada nas reações com oligonucleotídeos correspondentes à região NS5 de Febre Amarela possui marcação FAM-TAMRA (5' – 3'), que utiliza o fluoróforo FAM como fluoróforo emissor e o TAMRA como supressor. Já a sonda *TaqMan*® correspondente à região de junção E/NS1 é marcada com o fluoróforo NED e um supressor não fluorescente MGB, que estabiliza a sonda, permitindo maior especificidade e facilitando a quantificação de sequências alvo mais difíceis, além de aumentar a temperatura de dissociação (*Applied Biosystems*™).

É possível que a eficiência mais baixa observada nos ensaios que tiveram como alvo a região E/NS1 tenha sido causada pela diferença na marcação da sonda *TaqMan*®. Na publicação de Mantel e colaboradores, 2008, todas as sondas *TaqMan*® para os quatro sorotipos possuem marcação FAM/TAMRA. Neste estudo foi desenhada uma sonda com marcação distinta para cada sorotipo visando estabelecer em um primeiro momento um PCR individual para cada químera e no futuro estabelecer uma reação multiplex.

#### **4.4. Comparação entre ensaios de etapa única utilizando *SYBR*<sup>®</sup> *Green* (região E/NS1) e em duas etapas utilizando *TaqMan*<sup>®</sup> (região NS5)**

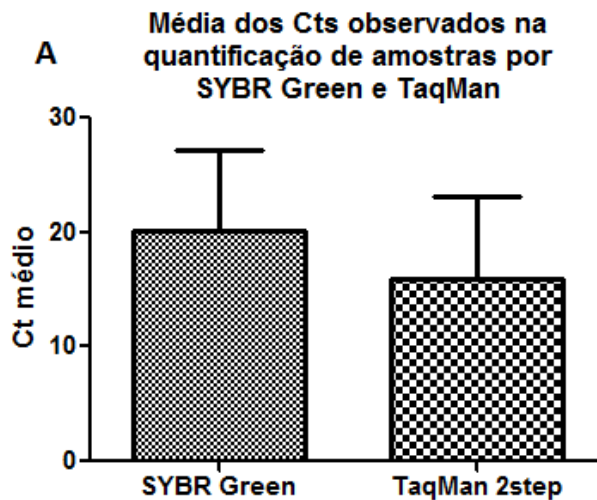
Após o sequenciamento das quimeras, realizado pelo LATER, que trabalha em colaboração com o LATEV no projeto da vacina quimérica contra dengue, observamos que os oligonucleotídeos publicados no trabalho de Mantel e colaboradores (2008) não eram correspondentes às quimeras do projeto. O resultado do sequenciamento só foi disponibilizado após a escolha do protocolo. No caso da FA17D/DEN1, o iniciador senso é correspondente, além da região E/NS1, a mais uma região inesperada, prejudicando a amplificação do fragmento. A sonda desenhada para a quimera de dengue 2 não possui região correspondente à FA17D/DEN2 e a sonda para a quimera de dengue 4 também possui mais de uma região correspondente em FA17D/DEN4. Os oligonucleotídeos de dengue 3 possuem região de correspondência em FA17D/DEN3: o iniciador senso possui região 96% correspondente, o reverso 100% e a sonda 94%..

Com isso, um novo conjunto de oligonucleotídeos foi desenhado para reconhecer essas quimeras. A partir da chegada destes oligonucleotídeos, iniciamos a padronização e os testes com *SYBR*<sup>®</sup> *Green*, em etapa única. Foram analisadas 75 amostras utilizando este sistema e tendo a região E/NS1 como alvo. Estas mesmas amostras foram analisadas também pelo sistema *TaqMan*<sup>®</sup> em duas etapas, tendo a região NS5 de Febre Amarela como alvo, a fim de avaliar os ensaios de *SYBR*<sup>®</sup> *Green*, uma vez que já havia sido padronizado no laboratório o ensaio com *TaqMan*<sup>®</sup> avaliando a região NS5 do vírus da Febre Amarela.

Os resultados de  $C_{TS}$  obtidos para cada amostra utilizando os dois métodos foram comparados através de um teste t, e a diferença entre estes resultados se mostrou significativa, com p valor < 0,0001, com um  $R^2$  de 0,69 (Figura 4-12). Tendo os ensaios que utilizaram *TaqMan*<sup>®</sup> se mostrando mais sensíveis que os que utilizaram o *SYBR*<sup>®</sup> *Green*.

Depois de verificar que a análise das mesmas amostras utilizando o mesmo sistema (*TaqMan*<sup>®</sup>), para regiões distintas, apresentaram uma diferença na quantificação, resolvemos avaliar se mudando o sistema de quantificação estas diferenças permaneceriam ou diminuiriam.

No entanto observamos que a diferença permanecia e que a quantificação através da região NS5 continuou maior quando comparada com a quantificação avaliada pela região E/NS1 e de forma estatisticamente significativa (cerca de 2 a 3  $C_{TS}$  de diferença).



**Figura 4-12.** Comparação entre as médias dos CTs observados através da amplificação de um grupo de amostras utilizando o sistema TaqMan® em reações de duas etapas e o SYBR Green®.

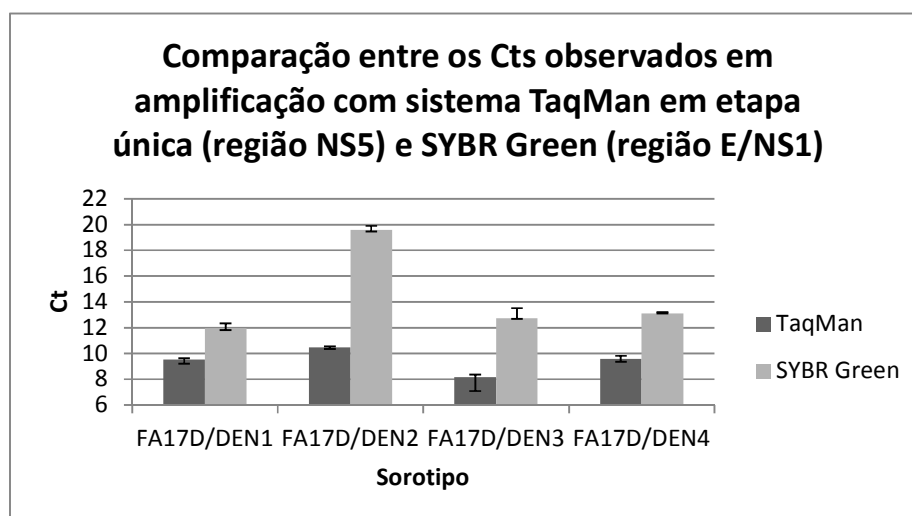
#### 4.5. Comparação entre ensaios de etapa única utilizando *SYBR® Green* e *TaqMan®*

A fim de avaliar se a diferença observada entre os resultados anteriores estava relacionada ao fato de o grupo de ensaios feitos com *TaqMan®* ser realizado em duas etapas e o grupo realizado com *SYBR® Green* era feito em uma etapa única, selecionamos um grupo de 35 amostras para ser avaliado com os dois sistemas, *TaqMan®* e *SYBR® Green*, ambos em etapa única. No entanto, observamos novamente que os ensaios com *TaqMan®* apresentavam  $C_{T_s}$  mais baixos e a diferença entre as médias de  $C_{T_s}$  se mostrou significativa, também tendo sido avaliada por um teste t, apresentando um p com valor  $< 0,0001$  e um  $R^2$  igual a 0,86 (Figuras 4-13 e 4-14).

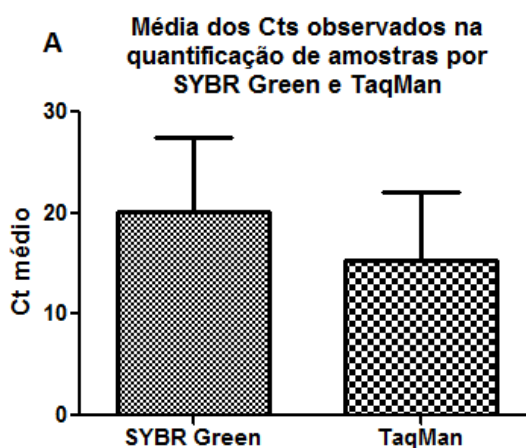
Tanto na comparação com o sistema *TaqMan®* em duas etapas quanto em etapa única, as amostras quantificadas pelo sistema *SYBR® Green* apresentaram valores de  $C_{T_s}$  e sensibilidade mais baixos. No entanto, o que pode ser observado mais comumente na literatura é uma sensibilidade maior deste sistema em relação ao *TaqMan®* (Gomes-Ruiz et al, 2006; Richardson et al, 2006; Kumar et al, 2012). As reações com *SYBR® Green* costumam ser mais sensíveis até mesmo pelo fato de serem menos específicas e não serem afetadas por pequenas mutações que possam ser apresentadas pelos genomas analisados, enquanto o sistema *TaqMan®* pode ter sua sensibilidade diminuída em até 47% com apenas uma mutação pontual (Paudel et al, 2011). As regiões amplificadas inespecíficas ou a formação de dímeros de oligonucleotídeos iniciadores

podem levar a uma superestimação da quantificação viral, por isso é muito importante que seja feita a análise da curva de dissociação ao fim da reação.

No entanto, também já foram descritas na literatura situações onde as reações com *SYBR*<sup>®</sup> *Green* apresentaram sensibilidade igual ou menor que as com *TaqMan*<sup>®</sup> (Paudel et al, 2011). Isto pode ocorrer quando a reação com *SYBR*<sup>®</sup> *Green* ainda requer ajustes. Devido à sua característica inespecífica, é mais difícil padronizar uma reação com *SYBR*<sup>®</sup> *Green* do que com *TaqMan*<sup>®</sup> (Arya et al, 2005).



**Figura 4-13.** Comparação entre CTs observados através da amplificação de pontos de cinéticas virais dos 4 sorotipos por SYBR Green<sup>®</sup> e TaqMan<sup>®</sup> em etapa única.



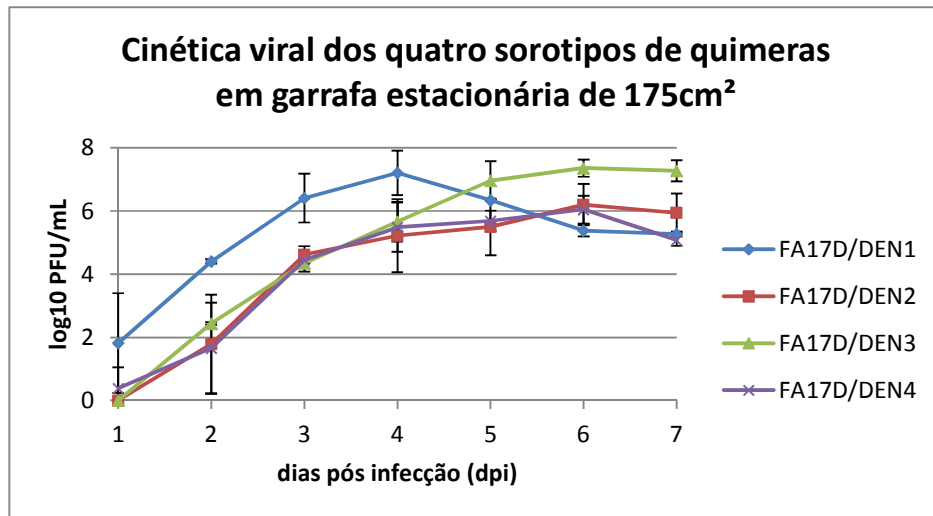
**Figura 4-14.** Comparação entre as médias dos CTs observados através da amplificação de pontos de cinéticas virais dos 4 sorotipos por SYBR Green<sup>®</sup> e TaqMan<sup>®</sup> em etapa única.

#### **4.6. Comparação entre os ensaios de titulação por formação de placas de lise (PFU/mL) e RT-qPCR (cópias/mL)**

Durante o processo de desenvolvimento de uma vacina, é necessário que se determine o perfil cinético da propagação viral, a fim de determinar o pico de produção do antígeno de interesse e quando este é atingido. No projeto de Vacina de Dengue Recombinante desenvolvido no LATEV, atualmente, a propagação das quimeras tem sido realizada em garrafas estacionárias, porém diante da necessidade de escalonamento da produção de vírus, ensaios para avaliar a cinética de replicação viral no sistema de *cell factories* foram realizados. O sistema de *cell factories* é capaz de aumentar a superfície celular, portanto a quantidade de vírus produzido para estes ensaios foram realizadas através de curvas de crescimento em *cell factories* de 2, 4 e 10 andares. Para avaliar a melhor condição de propagação, as amostras foram coletadas e quantificadas por RT-qPCR e tituladas através do ensaio de formação de placas de lise. Os resultados obtidos em cópias de RNA/mL (ensaios em etapa única utilizando *SYBR<sup>®</sup> Green*) e PFU/mL foram, então, comparados e analisados com a ajuda do programa *GraphPad Prism<sup>®</sup>* a fim de avaliar se a diferença encontrada entre as duas avaliações era significativa.

##### **4.8.1 Cinética viral em garrafa estacionária**

Antes das *cell factories* serem utilizadas, as propagações virais eram realizadas em garrafas estacionárias de 175cm<sup>2</sup>. Estas amostras não chegaram a ser quantificadas por RT-qPCR, mas sim por ensaio de placas de lise. Ao analisar o perfil da cinética de cada sorotipo das quimeras, observamos que o pico de crescimento viral era observado no quinto dia após a infecção das quimeras (Figura 4-15), com exceção de FA17D/DEN1, que atinge seu maior título no quarto dia.



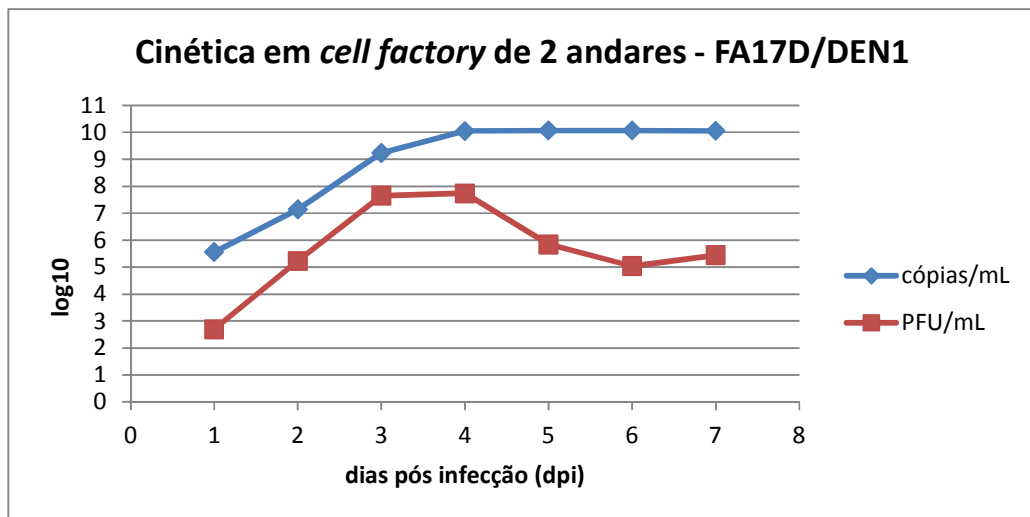
**Figura 4-15.** Perfil da cinética viral das quimeras dos quatro sorotipos em propagação realizada em garrafas estacionárias ventiladas de 175cm<sup>2</sup>, em meio VP-SFM.

#### 4.8.2 Cinética viral em *cell factory*

Foram testadas no projeto três apresentações diferentes de *cell factories*, sendo elas 2, 4 ou 10 andares. Para cada apresentação e sorotipo da quimera, foram feitas curvas de propagação viral, a fim de avaliar o padrão de comportamento viral e a eficiência das diferentes apresentações. Inicialmente, foram testadas as *cell factories* 2 andares, com a coleta diária de amostras, ao longo dos 7 dias seguintes ao dia da infecção. Após isto, tendo sido estabelecido o dia de início da fase de platô, as amostras passaram a ser coletadas somente nestes dias, durante os testes com as *cell factories* de 4 e 10 andares. As amostras coletadas foram então quantificadas por ensaios de RT-qPCR utilizando o sistema *SYBR Green*<sup>®</sup> (etapa única), tendo como alvo a região E/NS1, e tituladas através do ensaio de formação de placas de lise. Os resultados foram comparados abaixo (Figuras 4-16 a 4-19 e tabelas 4-2 a 4-5).

Quanto à cinética de propagação dos vírus, se manteve semelhante à observada na propagação feita em garrafa estacionária. Tendo o platô viral sido observado também no quinto dia após a infecção dos sistemas, novamente com exceção do FA17D/DEN1, que atinge o platô entre o terceiro e o quarto dia. Com a comparação entre a quantificação das amostras por titulação em placas de lise e através do RT-PCR em tempo real, podemos determinar os dias onde as amostras coletadas foram mais homogêneas, ou seja, onde encontramos não somente grande concentração de RNA viral, mas também de partículas infectantes. Isto é importante para diminuir a quantidade de partículas não infectantes, defectivas, RNAs livres ou outros inibidores

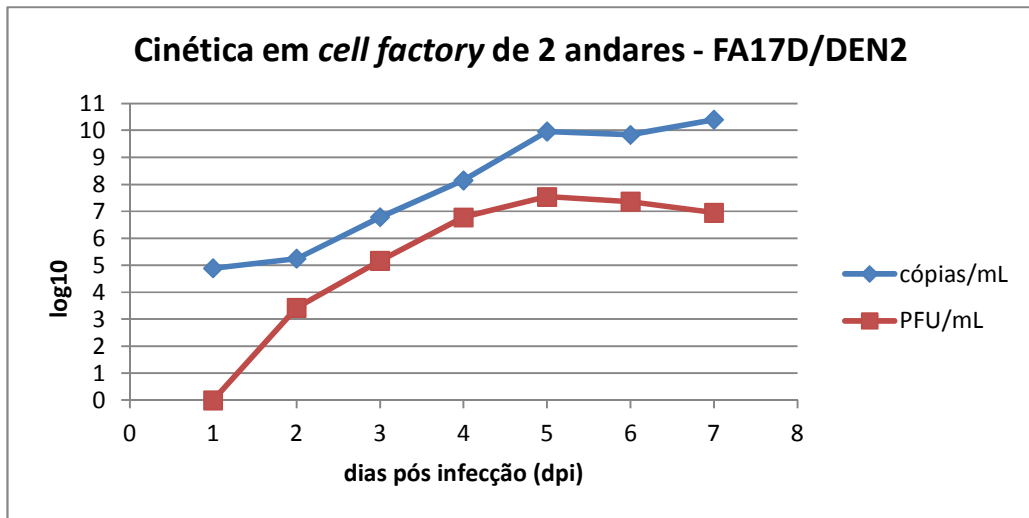
que possam fazer parte das amostras coletadas a partir da cultura viral. Os dias com amostras mais homogêneas podem ser observados nos gráficos seguintes (Figuras 4-16 a 4-20) e nas tabelas correspondentes (Tabelas 4-2 a 4-6) nos dias em que houve menor diferença entre as diferentes quantificações.



**Figura 4-16.** Comparação entre o log<sub>10</sub> do número de cópias/mL, quantificado por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinado pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN1 em cell factory de 2 andares.

**Tabela 4-2.** Relação dos resultados obtidos, em log<sub>10</sub>, do número de cópias/mL, determinada pela quantificação por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinada pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN1 em cell factory de 2 andares.

FA17D/DEN1				
dpi	Título (PFU/mL)*	Cópias RNA/mL*	Razão (RNA/mL/ PFU/mL/)	Diferença (RNA/mL/ PFU/mL/)
1	2,70	5,56	2,05	2,86
2	5,23	7,15	1,36	1,92
3	7,65	9,23	1,21	1,58
4	7,74	10,05	1,30	2,31
5	5,85	10,06	1,72	4,21
6	5,04	10,06	2,00	5,02
7	5,45	10,06	1,85	4,61

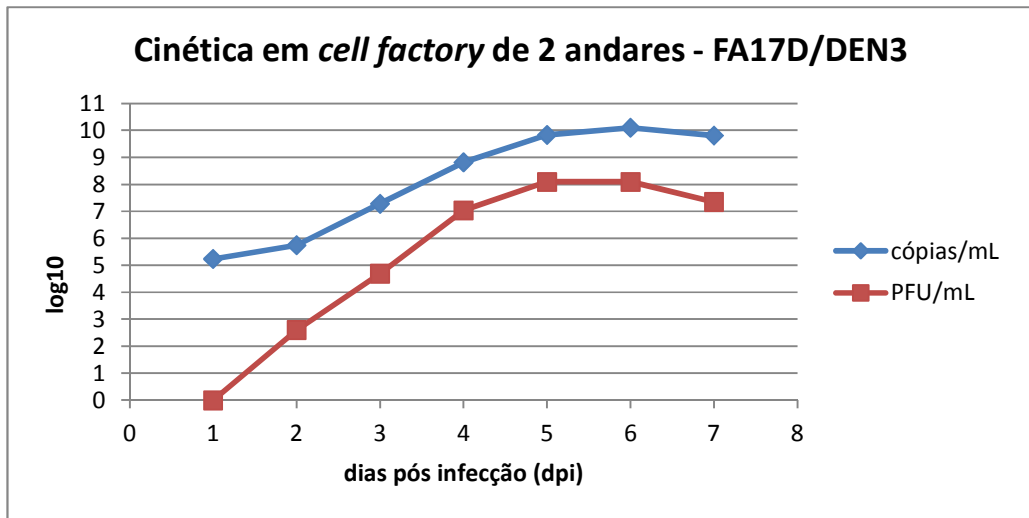


**Figura 4-17.** Comparação entre o log<sub>10</sub> do número de cópias/mL, quantificado por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinado pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN2 em *cell factory* de 2 andares.

**Tabela 4-3.** Relação dos resultados obtidos, em log<sub>10</sub>, do número de cópias/mL, determinada pela quantificação por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinada pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN2 em *cell factory* de 2 andares.

FA17D/DEN2				
dpi	Título (PFU/mL)*	Cópias RNA/mL*	Razão (RNA/mL/ PFU/mL/)	Diferença (RNA/mL/ PFU/mL/)
1	0	4,89	2,05	4,89
2	3,43	5,25	1,36	1,82
3	5,18	6,78	1,31	1,6
4	6,78	8,16	1,20	1,38
5	7,54	9,96	1,32	2,42
6	7,36	9,84	1,34	2,48
7	6,95	10,4	1,50	3,45

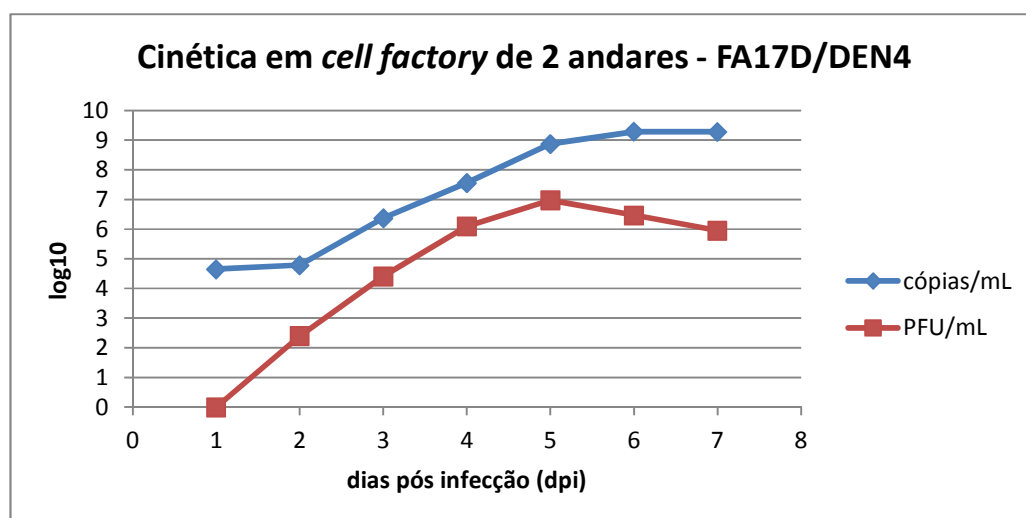




**Figura 4-18.** Comparação entre o log<sub>10</sub> do número de cópias/mL, quantificado por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinado pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN3 em cell factory de 2 andares.

**Tabela 4-4.** Relação dos resultados obtidos, em log<sub>10</sub>, do número de cópias/mL, determinada pela quantificação por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinada pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN3 em cell factory de 2 andares.

FA17D/DEN3				
dpi	Título (PFU/mL)*	Cópias RNA/mL*	Razão (RNA/mL/ PFU/mL/)	Diferença (RNA/mL/ PFU/mL/)
1	0	5,24	2,05	5,24
2	2,6	5,75	1,36	3,15
3	4,69	7,29	1,55	2,6
4	7,04	8,82	1,25	1,78
5	8,1	9,83	1,21	1,73
6	8,1	10,1	1,25	2
7	7,35	9,81	1,33	2,46



**Figura 4-19.** Comparação entre o log<sub>10</sub> do número de cópias/mL, quantificado por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinado pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN4 em cell factory de 2 andares.

**Tabela 4-5.** Relação dos resultados obtidos, em log<sub>10</sub>, do número de cópias/mL, determinada pela quantificação por RT-qPCR SYBR Green® (etapa única), e de PFU/mL, determinada pelo ensaio de placa de lise, observados na cinética viral da quimera FA17D/DEN4 em cell factory de 2 andares.

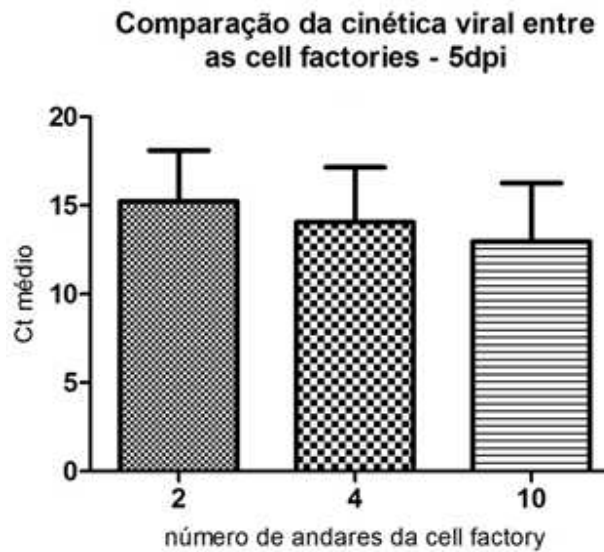
FA17D/DEN4				
dpi	Título (PFU/mL)*	Cópias RNA/mL*	Razão (RNA/mL/ PFU/mL/)	Diferença (RNA/mL/ PFU/mL/)
1	0	4,65	2,05	4,65
2	2,4	4,79	1,36	2,39
3	4,41	6,37	1,44	1,96
4	6,1	7,56	1,24	1,46
5	6,98	8,88	1,27	1,9
6	6,47	9,29	1,44	2,82
7	5,95	9,28	1,56	3,33

Ao analisarmos a diferença entre a quantificação do número de cópias de RNA/mL e a titulação em placa de lise (PFU/mL) observamos que a quimera FA17D/DEN1 apresentou a maior diferença (3,21 log<sub>10</sub>). Para as quimeras FA17D/DEN2, FA17D/DEN3 e FA17D/DEN4 a diferença encontrada foi em torno de 2,5 log<sub>10</sub>. Esta relação está de acordo com a observada na literatura em experimentos comparando análise quantitativa entre ensaios de placas de lise e RT-qPCR com flavivírus, que permanece em uma faixa de 2 a 3 logs de diferença entre o número de cópias de RNA e partículas infectantes (Rose et al, 1997; Bae et al, 2003; Richardson et al, 2006; Dash et al, 2012).

Em alguns casos, principalmente em amostras com o número de partículas virais muito baixo, como nos primeiros dias de uma curva de propagação viral, é comum que a RT-qPCR seja capaz de quantificar a amostra, enquanto o resultado do ensaio de placas de lise seja negativo. Isso pode acontecer porque a RT-qPCR é capaz de quantificar partículas virais não infecciosas, ou defeituosas (Rose et al, 1997; Bae et al, 2003) e por se tratar de um ensaio com a sensibilidade maior. Por outro lado também é possível que uma amostra com um determinado número de cópias RNA/mL muito baixo, não possa ser quantificada em uma RT-qPCR., principalmente quando o número de cópias está abaixo do limite de quantificação do ensaio, amostras neste caso podem apresentar um padrão de detecção variável sendo em alguns ensaios positivas e em outros negativas, estas amostras podem ser concentradas, porém ao se concentrar uma amostra os inibidores presentes também serão concentrados e portanto interferindo na quantificação. Por isso, muitas vezes uma variação entre ensaios pode estar atribuída principalmente ao processamento e preparação das amostras (Rose et al, 1997; Bae et al, 2003).

As vantagens da RT-qPCR em relação ao ensaio de formação de placas de lise são a rapidez e menor complexidade, mais fácil reprodutibilidade e quantificação de amostras com baixa concentração viral (maior sensibilidade). No entanto, a grande desvantagem do RT-qPCR em relação ao ensaio de placa, principalmente no caso de diagnóstico viral, é a dificuldade de diferenciar a presença de partículas infecciosas das partículas defeituosas. Estas geralmente só podem ser demonstradas em sistemas de cultura de células (Rose et al, 1997; Bae et al, 2003). Em 2009, de Paula e colaboradores demonstraram que através da detecção da fita de RNA negativa, que está presente somente durante a replicação do vírus da Hepatite A, podemos quantificar as partículas infecciosas, ou seja, aquelas que possuem a capacidade de se replicarem, diminuindo assim a quantificação de partículas defectivas.

Para analisar se havia uma diferença entre o perfil cinético dos vírus nas diferentes apresentações de *cell factory*, selecionamos os  $C_T$ s observados nos ensaios utilizando *SYBR*<sup>®</sup> *Green* do 5º dia, quando o perfil cinético das quimeras se encontrava na fase de platô depois da infecção dos sistemas e os comparamos através de uma ANOVA simples, utilizando o teste Tukey como pós-teste. Com esta análise confirmamos que a variação de  $C_T$  observada entre as diferentes apresentações de *cell factories* (2, 4 e 10 andares) não é estatisticamente significativa, tendo sido encontrado um valor de  $p > 0,05$  (0,6019) e um  $R^2$  igual a 0,107 (Figura 4-20).



**Figura 4-20.** Comparação entre o CT observado em quantificação por SYBR Green® em etapa única do ponto coletado no 5º dpi nas diferentes apresentações de cell factories com os quatro sorotipos de quimera.

#### 4.9. Análise estatística

Posto que o objetivo principal do projeto era estabelecer uma metodologia de RT-qPCR capaz de determinar o número de cópias/mL contidas em amostras de ensaios *in vitro* e testes em animais, a fim de tornar mais rápido o processo de monitoramento da carga viral ao longo das etapas do processo de desenvolvimento da vacina, selecionamos todas as amostras analisadas por SYBR® Green que também foram tituladas por ensaio de formação de placas de lise e aplicamos um teste de correlação paramétrica no programa *GraphPad Prism*®.

Com isso, foram correlacionadas as médias do número de cópias/mL, quantificadas por RT-qPCR com SYBR® Green, e do número de PFU/mL, quantificado pelo ensaio de formação de placas de lise, para cada sorotipo. Foram analisadas, para esta comparação, 14 amostras de cada sorotipo de quimera.

A análise de correlação descreve a associação entre duas variáveis, não fazendo distinção sobre o fato de uma ser causa ou consequência da outra. Este tipo de análise é feito quando desejamos avaliar o quanto consistentemente duas variáveis mudam em conjunto. Quando isso ocorre, diz-se que existe uma correlação ou uma covariação, que pode ter sua direção e magnitude quantificadas (Toledo e Ovalle, 1995).

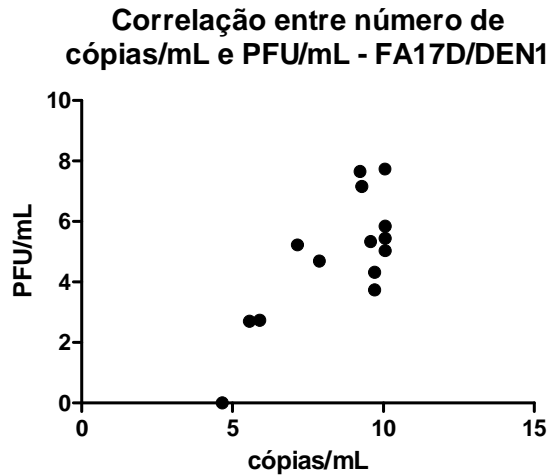
Em um diagrama de dispersão, às vezes é possível visualizar uma curva regular que se aproxima dos dados. Esta curva é denominada curva de ajustamento e, quando lembra uma reta e os dados parecem estar bem próximos a ela, dizemos que existe uma correlação linear entre as variáveis (Toledo e Ovalle, 1995). Esta correlação pode ser positiva ou negativa. Para dados contínuos em que ocorra uma correlação linear, o coeficiente de correlação pode ser determinado. O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida do grau de regressão linear entre duas variáveis quantitativas. Seus valores variam de -1 a 1. O valor 0 (zero) indica que não há relação linear, o 1 que existe uma relação linear perfeita direta e o -1, inversa. Quanto mais próximo este valor se encontrar de 1 ou -1, maior é a associação entre as variáveis analisadas. Os coeficientes de correlação, assim como muitas outras estatísticas, são mais informativos quando expressos como intervalos de confiança.

A correlação indica o grau de associação entre duas variáveis, enquanto a regressão se refere à capacidade de prever um valor baseado no conhecimento do outro. Para fazer uma regressão linear, determina-se qual a variável dependente (y), aquela que vai variar de acordo com a independente (x). O valor y pode ser determinado a partir do gráfico ou matematicamente, por meio da função  $y = \alpha + \beta x$ , onde  $\beta$  é a inclinação da reta e  $\alpha$  é a interseção da mesma com o eixo y. Com estas informações, é possível fazer previsões dos valores de y correspondentes a valores de x (Toledo e Ovalle, 1995).

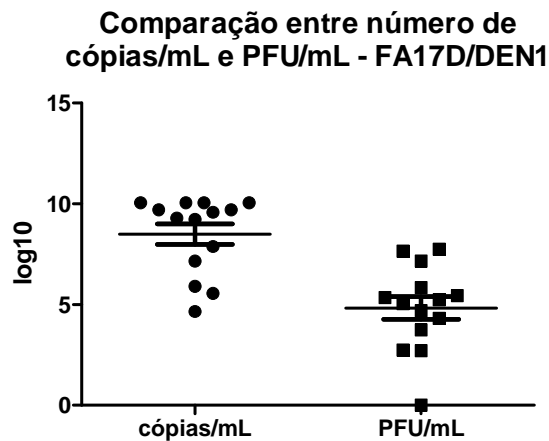
Esta análise mostrou que existe uma correlação significativa entre os resultados de FA17D/DEN1 ( $\alpha = 0,05$ ), com um r de 0,76 (com um intervalo de confiança de 0,39 a 0,92;  $R^2$  igual a 0,58) e um p igual a 0,0016 (Figuras 4-21 e 4-22).

Feita a regressão linear, obtivemos um *slope* de 0,839 ( $\pm 0,206$ ) e um *Y-interceptor* de -2,293 ( $\pm 1,792$ ). Com estes dados podemos estimar o valor de PFU/mL a partir de um resultado em cópias/mL através do uso da equação da reta, com a seguinte fórmula:

$$\text{Log}_{10} \text{ PFU/mL} = 0,839 \pm 0,206 \cdot \text{log}_{10} \text{ cópias/mL} - 2,293$$



**Figura 4-21.** Correlação entre os CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN1 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.



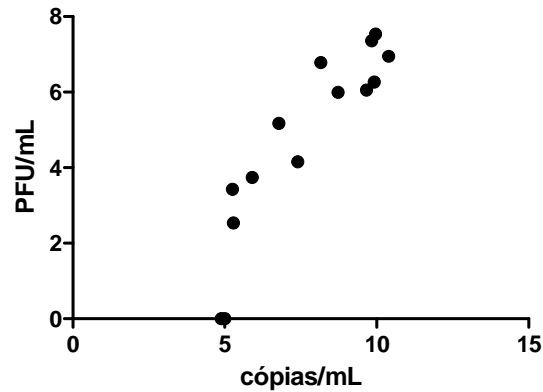
**Figura 4-22.** Comparação entre as médias CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN1 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.

Para a quimera FA17D/DEN2, foi observada uma correlação significativa ( $\alpha = 0,05$ ), entre os resultados com um  $r$  de 0,90 (com um intervalo de confiança de 0,71 a 0,97;  $R^2$  igual a 0,81) e um  $p < 0,0001$  (Figuras 4-23 e 4-24).

Feita a regressão linear, obtivemos um *slope* de 1,071 ( $\pm 0,15$ ) e um *Y-interceptor* de -3,485 ( $\pm 1,188$ ). Com estes dados podemos estimar o valor de PFU/mL a partir de um resultado em cópias/mL através do uso da equação da reta, com a seguinte fórmula:

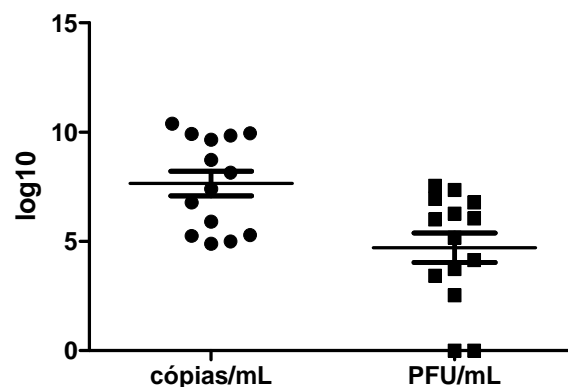
$$\text{Log}_{10} \text{ PFU/mL} = 1,071 \pm 0,15 \cdot \text{log}_{10} \text{ cópias/mL} - 3,485$$

### Correlação entre número de cópias/mL e PFU/mL - FA17D/DEN2



**Figura 4-23.** Correlação entre os CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN2 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.

### Comparação entre número de cópias/mL e PFU/mL - FA17D/DEN2



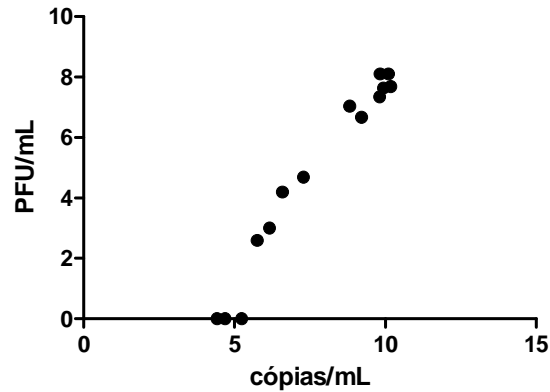
**Figura 4-24.** Comparação entre as médias CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN2 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.

Esta análise mostrou que existe uma correlação significativa entre os resultados de FA17D/DEN3 ( $\alpha = 0,05$ ), com um  $r$  de 0,98 (com um intervalo de confiança de 0,94 a 0,99;  $R^2$  igual a 0,96) e um  $p < 0,0001$  (Figuras 4-25 e 4-26).

Feita a regressão linear, obtivemos um *slope* de 1,415 ( $\pm 0,081$ ) e um *Y-interceptor* de -6,124 ( $\pm 0,647$ ). Com estes dados podemos estimar o valor de PFU/mL a partir de um resultado em cópias/mL através do uso da equação da reta, com a seguinte fórmula:

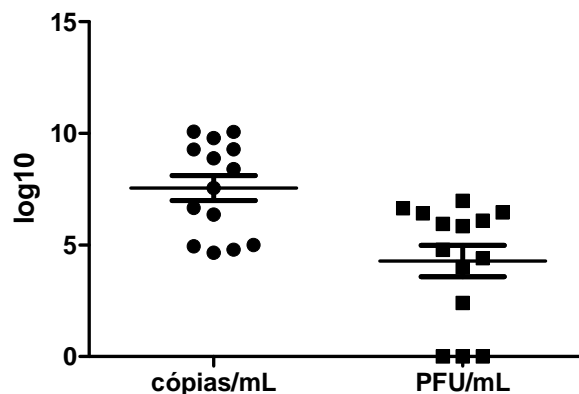
$$\text{Log}_{10} \text{ PFU/mL} = 1,415 \pm 0,081 \cdot \log_{10} \text{ cópias/mL} - 6,124$$

**Correlação entre número de cópias/mL e PFU/mL - FA17D/DEN3**



**Figura 4-25.** Correlação entre os CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN3 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.

**Comparação entre número de cópias/mL e PFU/mL - FA17D/DEN4**



**Figura 4-26.** Comparação entre as médias CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN3 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.

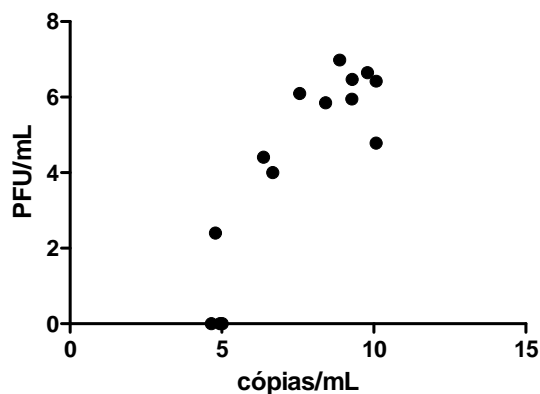
Esta análise mostrou que existe uma correlação significativa entre os resultados de FA17D/DEN4 ( $\alpha = 0,05$ ), com um  $r$  de 0,88 (com um intervalo de confiança de 0,66 a 0,96;  $R^2$  igual a 0,77) e um  $p < 0,0001$  (Figuras 4-27 e 4-28).

Feita a regressão linear, obtivemos um *slope* de 1,097 ( $\pm 0,170$ ) e um *Y-interceptor* de -4,006 ( $\pm 1,334$ ). Com estes dados podemos estimar o valor de PFU/mL a partir de um resultado em cópias/mL através do uso da equação da reta, com a seguinte fórmula:



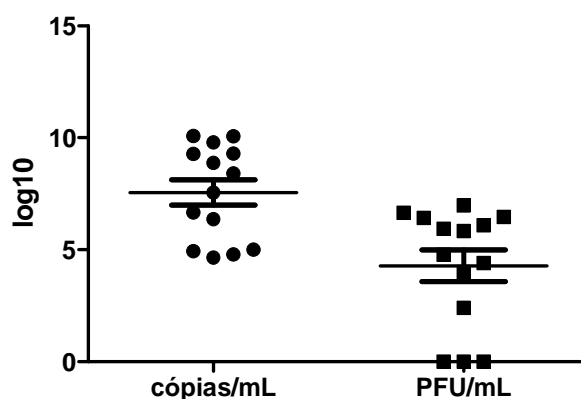
$$\text{Log}_{10} \text{ PFU/mL} = 1,097 \pm 0,170 \cdot \log_{10} \text{ cópias/mL} - 4,006$$

### Correlação entre número de cópias/mL e PFU/mL - FA17D/DEN4



**Figura 4-27.** Correlação entre os CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN4 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.

### Comparação entre número de cópias/mL e PFU/mL - FA17D/DEN4



**Figura 4-28.** Comparação entre as médias CTs observados em grupo de amostras de FA17D/DEN4 quantificados por SYBR Green® em etapa única e tituladas por ensaio de formação de placas de lise.

Os ensaios utilizando no sistema *SYBR Green*® mostraram-se menos sensíveis quando comparados com ensaios do sistema *TaqMan*®, porém esta perda de sensibilidade não interferiu no acompanhamento da cinética de propagação viral *in vitro* das quimeras, onde, em geral, observamos concentrações bastante elevadas de material genético viral. No entanto para avaliação de carga viral em amostras clínicas, onde a quantidade de material genético viral pode

vir a ser bem baixa, esta não seria a melhor metodologia a ser empregada, sendo necessária a utilização do sistema *TaqMan*<sup>®</sup>, que ainda precisa ser padronizado para as quimeras FA17D/DEN 1, 2 e 4. Uma alternativa para solucionar este problema seria a quantificação através da região NS5 de febre amarela, utilizando o sistema *TaqMan*<sup>®</sup>, que já está padronizada e validada em nosso laboratório.

Bae e colaboradores (2003) afirmem que a técnica de RT-qPCR não possa substituir o padrão ouro, o ensaio de formação de placas de lise pelo fato de que detecta apenas moléculas biológicas do genoma e não características biológicas, como o potencial infeccioso da partícula viral. No entanto, nossos resultados demonstraram que o estabelecimento de uma fórmula de regressão linear, permitiu estimar o valor de partículas infectantes a partir do valor de cópias quantificadas. Com isso é possível assumir que a técnica de RT-qPCR pode ser utilizada como uma ferramenta na quantificação viral durante as etapas do processo de monitoramento da vacina 17D/DENV1-4 candidata a vacina tetravalente contra dengue

## 5. CONCLUSÕES

- Foram padronizados ensaios de RT-qPCR para os quatro sorotipos de quimeras utilizando os sistemas *SYBR Green*<sup>®</sup> e *TaqMan*<sup>®</sup> (uma e duas etapas).
- Os ensaios com *TaqMan*<sup>®</sup> apresentaram maior sensibilidade (CTs mais baixos).
- A quantificação das quimeras pela região NS5 com o sistema *TaqMan*<sup>®</sup> em uma ou duas etapas se mostrou mais sensível que a quantificação pela região E/NS1 com o sistema *SYBR Green*<sup>®</sup>.
- Existe uma diferença estatisticamente significativa entre o número de cópias/mL e de PFU/mL, determinado pelas RT-qPCR e pelo ensaio de formação de placas de lise, respectivamente.
- O perfil da cinética de propagação das quimeras não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as diferentes apresentações de *cell factories* (2, 4 e 10 andares).
- Foi possível estabelecer uma correlação entre o número de cópias/mL e o número de PFU/mL observado nas reações de RT-qPCR e ensaio de formação de placas de lise, respectivamente.
- É interessante para o andamento do projeto realizar ensaios para as quimeras de Dengue1, 2 e 4 utilizando o sistema Taqman, testar o uso de fluoróforos diferentes para o mesmo alvo, construir uma curva padrão plasmideal para análise das quimeras e uma curva com o RNA transcrito *in vitro* e tentar estabelecer um PCR em Tempo Real multiplex.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. **Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections.** J Clin Microbiol, 2002; 40:376–381.
- Alonso A, Martin P, Albarran C, Garcia P, Primorac D, Garcia O, Fernández de Simón L, García-Hirschfeld J, Sancho M, Fernández-Piqueras J. **Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies.** Croat Med J, 2003; 44(3): 273-280.
- Anderson CR, Downs WG, Hill AE. **Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad.** Science, 1956; 124:224–225
- Anderson KB, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Mammen MP, Libraty DH, Rothman AL, Green S, Vaughn DW, Ennis FA, Endy TP. **Burden of symptomatic Dengue infection in children at primary school in Thailand: a prospective study.** Lancet, 2007; 369:1452-1459.
- ANONYMUS. **Dengue 3 in Central America. Dengue Surveillance. Summary. San Juan, Puerto Rico.** Division of Vector-Borne Infectious Diseases (CDC) [S.I.], 1995, v. 70.
- Araújo JMG, Bello G, Schatzmayr HG, Santos FB, Ribeiro RM. **Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009; 104:3.
- Arroyo J, Guirakhoo F, Fenner S, Zhang Z-X, Monath TP, Chambers TJ. **Molecular Basis for Attenuation of Neurovirulence of a Yellow Fever Virus/Japanese Encephalitis Virus Chimera Vaccine (ChimeriVax-JE).** J Virol, 2001; vol. 75, nº. 2: 934-942.
- Arroyo J, Miller C, Catalan J, Myers GA, Ratterree MS, Trent DW, Monath TP. **ChimeriVax-West Nile Virus Live-Attenuated Vaccine: Preclinical Evaluation of Safety, Immunogenicity, and Efficacy.** J Virol, 2004; vol. 78, nº. 22: 12497-12507.
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. **Basic principles of real-time quantitative PCR.** Expert Rev Mol Diagn, 2005; 5:209–219.
- Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, Garcia-Sastre A. **NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation.** J Virol, 2009; 83:5408–5418

- Bae HG, Nitsche A, Teichmann A, Biel SS, Niedrig M. **Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay.** J Virol Methods, 2003; 110(2):185-91.
- Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, Johnson S, Diamond MS, Beatty PR, Harris E. **Lethal antibody enhancement of Dengue disease in mice is prevented by Fc modification.** PLoS Pathogens, 2010; 6:e1000790.
- Bancroft TL. **On the aetiology of dengue fever.** Aust Med Gaz, 1906; 25:17-18.
- Barrett ADT, Higgs S. **Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered.** Annu Rev Entomol, 2007; 52:209–29.
- Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, Macagno A, Simonelli L, Quyen NTH, Sukupolvi-Petty S, Navarro-Sanchez E, Young PR, de Silva AM *et al.* **The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity.** Cell Host Microbe, 2010; 8:271-283.
- Blacksell SD, Mammen MP Jr, Thongpaseuth S, Gibbons RV, Jarman RG, Jenjaroen K, Nisalak A, Phetsouvanh R, Newton PN, Day NP. **Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos.** Diagn Microbiol Infect Dis, 2008; 60:43–49.
- Bio-Manguinhos (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos) – Fundação Oswaldo Cruz. **Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Detecção de Imunoglobulina M Anti-Dengue.** 2007.
- Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. **Development of a live attenuated Dengue virus vaccine using reverse genetics.** Viral Immunol, 2006; 19:10-32.
- Bonaldo MC, Caufour PS, Freire MS, Galler R. **The yellow fever 17D vaccine virus as a vector for the expression of foreign proteins: development of new live flavivirus vaccines.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000; 95(Suppl 1):215–23.
- Brien JD, Austin SK, Sukupolvi-Petty S, O'Brien KM, Johnson S, Fremont DH, Diamond MS. **Genotype specific neutralization and protection by antibodies against Dengue virus type 3.** J Virol, 2010; 84:10630-10643.
- Bronzoni RV, Madrid MC, Duarte DV, Pellegrini VO, Pacca CC, Carmo AC, Zanelli CF, Valentini SR, Santacruz-Pérez C, Barbosa JA, Lutz CS, Rahal P, Nogueira ML. **The small nuclear ribonucleoprotein U1A interacts with NS5 from yellow fever virus.** Arch Virol, 2011;156(6):931-8.
- Butler JM. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers.** (2nd ed.), Elsevier Academic Press, 2005.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE. **Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera.** J Gen Virol. 1989; 70 ( Pt 1):37-43.
- Câmara FP, Theophilo RLG, Santos TG, Pereira SRFG, Câmara, DCP, Matos RRC. **Estudo retrospectivo (histórico) da Dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas.** Rev Soc Bras Med Trop, 2007; 40(20): 192-196.
- Caufour PS. **Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses.** Virus Res, 2001; n°. 79: 1-14.

- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. **Flavivirus genome organization, expression, and replication.** *Annu. Rev. Microbiol.*, 1990; 44:649–88.
- Chambers TJ, Weir RC, Grakoui A, McCourt DW, Bazan JF, Fletterick RJ, et al. **Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1990b; 87(22):8898–902.
- Chambers TJ, Nestorowicz A, Amberg SM, Rice CM. **Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication.** *J Virol*, 1993; 67(11):6797-807.
- Chambers TJ, Nestorowicz A, Mason PW, Rice CM. **Yellow Fever/Japanese Encephalitis Chimeric Viruses: Construction and Biological Properties.** *J Virol*, 1999; vol. 73, n°. 4: 3095-3101.
- Chaturvedi UC, Nagar R. **Dengue and dengue haemorrhagic fever: Indian perspective.** *J Biosci*, 2008; 33(4): 429-41.
- Choi KH, Rossmann MG. **RNA-dependent RNA polymerases from Flaviviridae.** *Curr Opin Struct Biol*, 2009; 19(6):746-51.
- Clark DV, Mammen MP Jr, Nisalak A, Puthimethee V, Endy TP. **Economic impact of Dengue fever/Dengue hemorrhagic fever in Thailand at the family and population levels.** *Am J Trop Med Hyg*, 2005; 72:786-791.
- Coller B-AG, Clements DE. **Dengue vaccines: progress and challenges.** *Curr Opin Immunol*, 2011; 23(3):391–8.
- Costa CA da, Façanha GP. **Dengue virus serotypes in children of Manaus, State of Amazonas, 2008.** *Rev Soc Bras Med Trop*, 2011; 44(2):249–51.
- Costa RL, Voloch CM, Schrago CG. **Comparative evolutionary epidemiology of Dengue virus serotypes.** *Infection, Genetics and Evolution: J of Mol Epid and Evol Genet in Inf Dis* 12:2, 2012; 309-14.
- Cummings DAT, Iamsirithaworn S, Lessler JT, McDermott A, Prasanthong R, Nisalak A, Jarman RG, Burke DS, Gibbons RV. **The Impact of the demographic transition on Dengue in Thailand: insights from a statistical analysis and mathematical modeling.** *PLoS Med*, 2009; 6:e1000139.
- Dash PK, Boutonnier A, Prina E, Sharma S, Reiter P. **Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of YFV infection in *Aedes aegypti*.** *Virology J*, 2012; 9:27.
- Davidson AD. **Chapter 2. New insights into flavivirus nonstructural protein 5.** *Adv Virus Res.* 2009; 74:41-101. doi: 10.1016/S0065-3527(09)74002-3.
- de Paula VS, Perse AS, Amado LA, Morais LM, Lima SMB, Tourinho RS, Gaspar AMC, Pinto MA. **Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009; 28(10):1167-76.
- de Simone TS, Nogueira RMR, Araújo ESM, Guimarães FR, Santos FB, Schatzmayr HG, Souza RV, Teixeira Filho G, Miagostovich MP. **Dengue virus (DENV) surveillance: the co-circulation of DENV-1, 2 and 3 in the state of Rio de Janeiro, Brazil.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2004; 98: 553-562.

- de Souza VA, Fernandes S, Araújo ES, Tateno AF, Oliveira OM, Oliveira RR, Pannuti CS. **Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections.** J Clin Microbiol, 2004; 42:1782–1784.
- de Souza VA, Tateno AF, Oliveira RR, Domingues RB, Araújo ES, Kuster GW, Pannuti CS. **Sensitivity and specificity of three ELISAbased assays for discriminating primary from secondary acute dengue virus infection.** J Clin Virol, 2007; 39:230–233.
- Degallier N, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PF. **La Dengue et ses vecteurs au Brésil.** Bul Soc Pathol Exot, 1996; 89: 128–136.
- Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitkul W, Puttikhunt C, Edwards C, Duangchinda T, Supasa S, Chawansuntati K, Malasit P, Mongkolsapava J, Screaton G. **Cross-reacting antibodies enhance Dengue virus infection in humans.** Science, 2010; 328:745-748.
- Domingo C, de Ory F, Sanz JC, Reyes N, Gascón J, Wichmann O, Puente S, Schunk M, López-Vélez R, Ruiz J, Tenorio A. **Molecular and serologic markers of acute dengue infection in naïve and flavivirus-vaccinated travelers.** Diagn Microbiol Infect Dis, 2009; 65:42–48.
- Dorak MT. **Real-time PCR.** <http://www.dorak.info/genetics/glosrt.html> (Acessado em março de 2013).
- Renato Dulbecco. **Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus.** PNAS, 1952; 38:747-752.
- Ellencrona K, Syed A, Johansson M. **Flavivirus NS5 associates with host-cell proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and regulating synaptic membrane exocytosis-2 (RIMS2) via an internal PDZ binding mechanism.** Biol Chem, 2009; 390:319–323.
- Elshuber S, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. **Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus.** J Gen Virol, 2003; 84(Pt 1):183–91.
- Engel AR, Vasconcelos PFC, McArthur MA, Barrett ADT. **Characterization of a viscerotropic yellow fever vaccine variant from a patient in Brazil.** Vaccine, 2006; 24:2803–2809.
- Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. **Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins.** J Virol, 1991; 65(5):2467–75.
- Fauquet CM, Mayo MA, Manillof J, Desselberger U, Ball LA. **Family Flaviviridae.** CM In Fauquet, MA Mayo, J Manillof, U Desselberger, LA Ball, Virus taxonomy, Elsevier Academic Press, 2005, London; p. 981-988.
- Fernandes, A. G. **Padronização e validação de método de RT-PCR em tempo real para o vírus de febre amarela vacinal e cinética de replicação viral *in vitro*.** Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, 2012.
- Figueiredo L.T.M. **The Brazilian flavivirus.** Microbes Infect, 2000; 2:1643-1649.
- Figueiredo LTM. **Febres hemorrágicas por vírus no Brasil.** Rev da Soc Bras de Med Trop, 2006; 39(2): 203-210.
- Figueiredo RMP, Navega FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourão MPG, Costa CA, Farias IP. **Dengue virus type 4, Manaus, Brazil.** Emerg Infect Dis, 2008; 14(40): 667-669.

- Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, Jarman RG, Green S, Rothman AL, Cummings DA. **Serotype-specific differences in the risk of Dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006.** PLoS Negl Trop Dis, 2010; 4:e617.
- Galler R, Freire MS, Jabor AV, Mann GF. **The yellow fever 17D vaccine virus: molecular basis of viral attenuation and its use as an expression vector.** Braz. J. Med. Biol. Res, 1997; 30(2):157–68.
- Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LFC, Yamamura AMY, Jabor AV, Motta MCA, Bonaldo MC, Coutinho ESF, Freire MS. **Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-Dengue type 2 virus for rhesus monkeys.** Braz J Med Biol Res, 2005; vol.38, n°.12: 1835-1846
- García G, Sierra B, Pérez AB, Aguirre E, Rosado I, Gonzalez N, Izquierdo A, Pupo M, Danay Díaz DR, Sánchez L *et al.* **Asymptomatic Dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the Fc-gamma- RIIa polymorphism.** Am J Trop Med Hyg, 2010; 82:1153-1156.
- Gardner C, Ryman KD. **Yellow fever: a reemerging threat.** Clin Lab Med, 2010; 30(1):237-60.
- Gomes-Ruiz AC, Nascimento RT, de Paula SO, Lopes da Fonseca BA. **SYBR green and TaqMan real-time PCR assays are equivalent for the diagnosis of dengue virus type 3 infections.** J Med Virol, 2006; 78(6):760-3.
- Gomowski GD, Roehrig JT, Diamond MS, Lee JC, Pitcher TJ, Barrett ADT. **Mutations of an antibody binding energy hot spot on domain III of the Dengue 2 envelope glycoprotein exploited for neutralization escape.** Virology, 2010; 407:237-246.
- Gonçalves AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, Liprandi F. **Diversity and evolution of the envelope gene of Dengue virus type 1.** Virology, 2002; 303: 110-119.
- Gould EA, Solomon T. **Pathogenic flaviviruses.** Lancet, 2008; 371: 500-509.
- Gubler DJ. **Dengue and Dengue hemorrhagic fever.** Clin Microbiol Rev, 1998; 11(3): 480-496.
- Gubler DJ. **Epidemic Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: A Global Public Health Problem in the 21st Century.** Dengue Bulletin, 1997; vol 21.
- Gubler DJ. **The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems.** Arch Med Res, 2002; 33:330-342.
- Guirakhoo F, Zhang ZX, Chambers TJ, Delagrave S, Arroyo J, Barrett AD, Monath TP. **Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric yellow fever-Japanese encephalitis virus (ChimeriVax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis.** Virology, 1999; 257(2):363-372.
- Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, Georgakopoulos K, Catalan J, Ocran S, Soike K, Ratterree M, Monath TP. **Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-Dengue virus tetravalent vaccine.** J Virol, 2001; 75(16):7290-304.
- Guirakhoo F. **A single amino acid substitution in the envelope protein of chimeric yellow fever-Dengue 1 vaccine virus reduces neurovirulence for suckling mice and viremia/viscerotropism for monkeys.** J Virol, 2004; n°.18, v.78: 9998-10008.



- Guirakhoo F, Kitchener S, Morrison D, Forrat R, McCarthy K, Nichols R, Yoksan S, Duan X, Ermak TH, Kanesa-Thanan N *et al.* **Live attenuated chimeric yellow fever Dengue type 2 (ChimeriVax™-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity.** Hum. Vaccines, 2006; 2:60-67.
- KR Gurukumar,1 D Priyadarshini,1 JA Patil,1 A Bhagat,1 A Singh,1 PS Shah,1 and D Cecilia. **Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses.** Virol J, 2009; 6: 10.
- Guy B. **Immunogenicity of Sanofi Pasteur tetravalent Dengue vaccine.** J Clin Virol, 2009; 46:16-19.
- Guy B, Almond JW. **Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges.** Comp Immun, Microb Infect Dis, 2008; 2-3:239-252.
- Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J. **Preclinical and clinical development of FA 17D-based chimeric vaccines against Dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses.** Vaccine, 2010a; 28:632-649.
- Guy B, Nougarede N, Begue S, Sanchez V, Souag N, Carre M, Chambonneau L, Morrisson DN, Shaw D, Qiao M *et al.* **Cell mediated immunity induced by chimeric tetravalent Dengue vaccine in naïve or flavivirus-primed subjects.** Vaccine, 2008; 26:5712-5721.
- Guy B, Saville M, Lang J. **Development of Sanofi Pasteur tetravalent Dengue vaccine.** Hum Vaccines, 2010b; 6:696-705.
- Guzmán MG. **Global voices of science. Deciphering dengue: the Cuban experience.** Science, 2005; 309(5740): 1495-7.
- Guzmán MG. *et al.* **Dengue: A continuing global threat.** Nature Rev Microb, 2010; 8, S7-S16.
- Guzmán MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. **Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997.** Cuban outbreaks Rev Panam Salud Publica, 2002; 2:223-227.
- Guzmán A, Istúriz RE. **Update on the global spread of Dengue.** Int J Antimicrob Agents, 2010; 36(Suppl. 1):S40-S42.
- Guzmán MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E *et al.* **Dengue: a continuing global threat.** Nat Rev Microbiol, 2010; 8(Suppl. 12):S7-S16.
- Guzmán MG, Kourí G. **Advances in dengue diagnosis.** Clin Diagn Lab Immunol, 1996; 3:621-627.
- Hahn YS, Galler R, Hunkapiller T, Dalrymple JM, Strauss JH, Strauss EG. **Nucleotide sequence of Dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flaviviruses.** Virology, 1988; 162(1):167-80.
- Halstead SB. **Observations related to pathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion.** Yale J Bio Med, 1970; 42:350-360.
- Halstead SB. **Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology.** Science, 1988; 239:476-81.
- Halstead SB. **Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ?** Pan Am J Public Health, 2006; 20:407-415.

- Halstead SB. **Dengue**. Lancet, 2007; 370:1644-1652.
- Halstead SB. **Antibodies determine virulence in Dengue**. Ann N Y Acad Sci, 2009; 1171(Suppl. 1):E48-56.
- Halstead SB. **Dengue vaccine development: a 75% solution?** Lancet, 2012; 380(9853):1535-6.
- Halstead SB, Deen J. **The future of Dengue vaccines**. Lancet, 2002; 360(9341):1243-5.
- Halstead SB, Marchette NJ. **Biologic properties of Dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii**. Am J Trop Med Hyg, 2003; 69: 5-11.
- Halstead SB, Streit TG, LaFontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, Kanesa-thasan N, Hayes CG, Watts DM: Haiti. **Absence of Dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic Dengue virus transmission**. Am J Trop Med Hyg, 2001; 65:180-183.
- Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. **Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand**. Science, 1960; 131: 1102-1103.
- Hang VTT, Holmes EC, Veasna D, Quy NT, Hien TT, Quail M, Churcher C, Parkhill J, Cardoso J, Farrar J *et al*. **Emergence of the Asian 1 genotype of Dengue virus serotype 2 in Viet Nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia**. PLoS Negl Trop Dis, 2010; 4:e757.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. **Real time quantitative PCR**. Genome Res, 1996; 6(10): 986-994.
- Henchal EA, Putnak JR. **The dengue viruses**. Clin Microbiol Rev, 1990; 3(4): 376-96.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions**. Biotechnology (NY), 1993; 11(9): 1026-1030.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. **Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase**. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88(16): 7276-7280.
- Hombach J. **Vaccines against Dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages**. Rev. Panam. Salud Publica, 2007; 21(4):254-60.
- Honório NA, Silva WC, Leite PJ, Gonçalves JM, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R. **Dispersal of Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil**. Mem Inst Oswaldo Cruz, vol.98, no.2, Rio de Janeiro, 2003.
- Innis BL, Eckels KH, Kraiselburd E, Dubois DR, Meadors GF, Gubler DJ, Burke DS, Bancroft WH. **Virulence of a live dengue virus vaccine candidate: a possible new marker of dengue virus attenuation**. J Infect Dis, 1998, 158:876-880.
- Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke CH. **An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate**. Am J Trop Med Hyg, 1989; 40:418-427.
- Jan L-R, Yang C-S, Trent DW, Falgout B, Lai C-J. **Processing of Japanese Encephalitis Virus Non-Structural Proteins: NS2B-NS3 Complex and Heterologous Proteases**. J Gen Virol, 1995; 76(3):573-80.

- Johansson MA, Dominici F, Glass GE. **Local and global effects of climate on Dengue transmission in Puerto Rico.** PLoS Negl Trop Dis, 2009; 3(2):e382.
- Kamil SM, Mohamad N H, Narazah M Y, Khan F A. **Dengue haemorrhagic fever with unusual prolonged thrombocytopenia.** Singapore Med J, 2006; 47(4): 332-334.
- Keating J. **An investigation into the cyclical incidence of Dengue fever.** Social Science & Medicine, 2001; 53: 1587–1597.
- King NJ, Shrestha B, Kesson AM. **Immune modulation by flaviviruses.** Adv Virus Res, 2003; 60:121–55.
- Kitchener S, Nissen M, Nasveld P, Forrat R, Yoksan S, Lang J, Saluzzo JF. **Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent Dengue vaccine formulations in healthy Australian adults.** Vaccine, 2006; 24:1238-1241.
- Koraka P, Suharti C, Setiati TE, Mairuhu AT, Van Gorp E, Hack CE, Juffrie M, Sutaryo J, Van Der Meer GM, Groen J, Osterhaus AD. **Kinetics of dengue virus-specific immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection.** J Clin Microbiol, 2001; 39:4332–4338.
- Kouri G, Guzman MG, Bravo J. **Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic.** Bull. PAHO, 1986; 20 (1): 24-30.
- Knowlton K, Solomon G, Rotkin-Ellman M. **Mosquito-Borne Dengue Fever Threat Spreading in the Americas.** NRDC Issue Paper, 2009.
- Kraiselburd E, Gubler DJ, Kessler MJ. **Quantity of Dengue virus required to infect rhesus monkeys.** Trans R Soc Trop Med Hyg, 1985; 79(2):248–51.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. **The Real-time Polymerase Chain Reaction.** Mol Aspects Med, 2006, 27:95-125.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, *et al.* **Structure of Dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion.** Cell, 2002; 108(5):717–25.
- Kumar B, Kumar P, Rajput R, Daga MK, Singh V, Khanna M. **Comparative reproducibility of SYBR Green I and TaqMan real-time PCR chemistries for the analysis of matrix and hemagglutinin genes of Influenza A viruses.** Internat J Collab Res Intern Med & Pub Health, 2012; vol. 4, n<sup>o</sup>. 7: 1346-1352.
- Kümmerer BM, Rice CM. **Mutations in the Yellow Fever Virus Nonstructural Protein NS2A Selectively Block Production of Infectious Particles.** J Virol, 2002; 76(10):4773–84.
- Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. **An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections.** J Virol Methods, 1992; 33:101–113.
- Lai CY, Chung YK, Tan HC, Yap HF, Yap G, Ooi EE, Ng LC. **Cost-Effective Real-Time Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) To Screen for Dengue Virus followed by Rapid Single-Tube Multiplex RT-PCR for Serotyping of the Virus.** J Clin Microb, 2007; vol. 45, n<sup>o</sup>. 3: 935–941.
- Lai CY, Tsai W-Y, Lin S-R, Kao C-L, Hu H-P, King C-C, Wu H-C, Chang G-J, Wang W-K. **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. *J Virol*, 2008; 82:6631-6643.

Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. **Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for Dengue virus transmission.** *PLoS Negl Trop Dis*, 2010; 4:e646.

Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. **Molecular evolution and epidemiology of dengue 3 viruses.** *J Gen Virol*, 1994; 75:65-75

Lang J. **Recent progress on Sanofi Pasteur's Dengue vaccine candidate.** *J Clin Virol*, 2009; 46:20-24.

Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Reed G, Ennis FA, Rothman AL, Green S. **Dengue virus (DV) enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection.** *J Infect Dis*, 2005; 192:510-519.

Le Breton M, Meyniel-Schicklin L, Deloire A, Coutard B, Canard B, Lamballerie X, Andre P, Roubourdin-Combe C, Lotteau V, Davoust N. **Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen.** *BMC Microbiology*, 2011; 11:234.

Leung J, Pijlman G, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie J, Khromykh A. **Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly.** *J Virol*, 2008; vol. 82 n°. 104731-4741.

Libraty DH, Acosta LP, Tallo V, Segubre-Mercado E, Bautista A, Potts JA, Jarman RG, Yoon IK, Gibbons RV, Brion JD, Capeding RZ. **A prospective nested case-control study of Dengue in infants: rethinking and refining the antibody dependent enhancement Dengue hemorrhagic fever model.** *PLoS Med*, 2009; 6:e1000171.

Libraty DH, Endy TP, Houg HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Chansiriwongs W, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. **Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary Dengue-3 virus infections.** *J Infect Dis*, 2002; 185:1213-1221.

Lin RJ, Chang BL, Yu HP, Liao CL, Lin, YL. **Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism.** *J Virol*, 2006; 80:5908-5918. *Mazzonet al*, 2009;

Lindenbach BD, Rice CM. **Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function.** *Virol*, 1999; 73(6):4611-21.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. **Flaviviridae: The Viruses and Their Replication (Cap. 33).** *Fields Virology*. 5<sup>a</sup> ed; DM. Knipe e PM. Howley, Eds.; 2007; 1101-1152.

Linnen JM, Vinelli E, Sabino EC, Tobler LH, Hyland C, Lee T-H, *et al* **Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia.** *Transfusion*, 2008; 48(7):1355-62.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. **Real-time PCR in virology.** *Nucleic Acids Res*, 2002; 30(6):1292-305.

Mackay M, Arden E, Nitsche A. **Real-time PCR in Virology.** *Nucleic Acids Res*, 2002; vol. 30, n° 6: 1292 - 1305.

Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne, SL. **Dengue viral infections.** *Postgrad Med J*, 2004; 80:588-601.

- Malavige GN, Velathanthiri VGNS, Wijewickrama ES, Fernando S, Jayaratne SD, Aaskov J, Seneviratne SL. **Patterns of disease among adults hospitalized with Dengue infections.** QJM: An Int J Med, 2006; 99: 299-305.
- Manojkumar R, Mrudula V. **Applications of Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Clinical Virology Laboratories for the Diagnosis of Human Diseases.** Am J Infec Dis, 2006; 2(4): 204-209.
- Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, Barban V. **Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-Dengue vaccines.** J Virol Methods, 2008; 151(1):40-6.
- Martins FSV, Castineiras TMPP [on line]. **Dengue – Cives – Centro de Informação em Saúde para Viajantes – UFRJ.** 2007.
- Mateu GP. **Construction and biological properties of yellow fever 17D/dengue type 1 recombinant virus.** The Royal Soc Trop Med Hyg, 2007; n°. 101: 289-298.
- Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, Dussart P. **Discrimination between primary and secondary dengue virus infection by an immunoglobulin G avidity test using a single acute-phase serum sample.** J Clin Microbiol, 2005; 43:2793–2797.
- Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, Dussart P. **Use of four dengue virus antigens for determination of dengue immune status by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G avidity.** J Clin Microbiol, 2005b; 43:5785–5786.
- Medronho RA. **Challenges for Dengue control in Brazil.** Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2008; 24(5): 948-949.
- Medronho RA. **Dengue e o ambiente urbano.** Rev Bras Epid, 2006; 9(2): 159-61.
- Miagostovich MP, Nogueira RMR, Cavalcanti SMB, Marzochi KBF, Schatzmayr HG. **Dengue epidemic in the State of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects.** Rev Inst Med Trop São Paulo, 1993; 35:149-154.
- Miagostovich MP, Sequeira PC, Dos Santos FB, Maia A, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Harris E, Riley LW. **Molecular typing of Dengue virus type 2 in Brazil.** Rev Inst Med Trop São Paulo, 2003; 45: 17-21.
- Ministério da Saúde – Fundação Nacional de Saúde [on line]. **Programa Nacional de Controle da Dengue.** 2002 [capturado em 13 jul. 2007] Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pncd\\_2002.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pncd_2002.pdf)
- Mohammed H, Linnen JM, Muñoz-Jordán JL, Tomashek K, Foster G, Broulik AS, *et al.* **Dengue virus in blood donations, Puetarto Rico, 2005.** Transfusion, 2008; 48(7):1348–54.
- Monath TP. **Facing up to re-emergence of urban yellow fever.** Lancet, 1999; 353(9164):1541.
- Monath TP. **Dengue and yellow fever--challenges for the development and use of vaccines.** N Engl J Med, 2007; 357(22):2222–5.
- Monath TP. **Treatment of yellow fever.** Antiviral Res, 2008; 78(1):116-24.
- Monath TP, Levenbook I, Soike K, Zhang Z-X, Ratterree M, Draper K, Barrett ADT, Nichols R, Weltzin R, Arroyo J, Guirakhoo F. **Chimeric Yellow Fever Virus 17D-Japanese Encephalitis Virus Vaccine: Dose-Response Effectiveness and Extended Safety Testing in Rhesus Monkeys.** J Virol, 2000; vol. 74, n° 4: 1742-1751.

- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X-N, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S *et al.* **Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of Dengue hemorrhagic fever.** *Nat Med*, 2003; 9:921-927.
- Morens DM, Fauci AS. **Dengue and hemorrhagic fever: a potential threat to public health in the United States.** *JAMA*, 2008; 299:214-216.
- Morrison D, Legg TJ, Billings CW, Forrat R, Yoksan S, Lang J. **A novel tetravalent Dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naïve adults.** *J Infect Dis*; 2010; 201:370-377.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. **A structural perspective of the flavivirus life cycle.** *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(1):13-22.
- Nagao Y, Koelle K. **Decreases in dengue transmission may act to increase the incidence of dengue hemorrhagic fever.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105(6): 2238-43.
- Nicklas JA, Buel E. **Quantification of DNA in forensic samples.** *Anal Bioanal Chem*, 2003; 376(8): 1160-1167.
- Niesters HG. **Quantitation of viral load using real-time amplification techniques.** *Methods*, 2001; 25(4):419-29.
- Nishiura H, Halstead SB. **Natural history of Dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 infections: reanalysis of classic studies.** *J Infect Dis*, 2007; 195(7):1007–13.
- Nogueira RM, Zagner SM, Martins IS, Lampe E, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. **Dengue haemorrhagic fever/Dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1991; 86: 269.
- Nogueira RMR, Araújo JMG, Schatzmayr, HG. **Dengue viruses in Brazil, 1986-2006.** *Pan Am J Pub Health*, 2007; 22(5): 358-363.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Araújo RSM, Santis FB, Filippis SMB, Souza RW, Zagne SMO, Nicolai C, Baran M, Teixeira Filho G. **Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998.** *Mem Inst Osw Cruz*, 1999; 94:297-304.
- Noisakran S, Chokephaibulkit K, Songprakhon P, Onlamoon N, Hsiao H-M, Villinger F, Ansari A, Perng GC. **A re-evaluation of the mechanisms leading to Dengue hemorrhagic fever.** *Ann NY Acad Sci*, 2009; 1171:E24-35.
- Novais CM, Pires-Alves M. **PCR em tempo real.** *Biotec Ciência & Desenvolv*, 2004; 33:10-13.
- Nunes MRT, Palacios G, Nunes KNB, Casseb SMM, Savji N, Lipkin WI, Vasconcelos PFC. **Evaluation of two molecular methods for the detection of yellow fever virus genome.** *J Virol Meth*, 2011; 174: 29-34.
- O'Reilly EK, Kao CC. **Analysis of RNA-Dependent RNA Polymerase Structure and Function as Guided by Known Polymerase Structures and Computer Predictions of Secondary Structure.** *Virology*. 20 de dezembro de 1998;252(2):287–303.
- Ooi EE, Gubler DJ. **Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention.** *Cad Saúde Pub*, 2009; 25(Suppl. 1):S115-S124.

- Op De Beeck A, Molenkamp R, Caron M, Ben Younes A, Bredenbeek P, Dubuisson J. **Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of yellow fever virus envelope.** *J Virol*, 2003; 77(2):813-20.
- PAHO (Pan American Health Organization). **Dengue in the Americas 1980-1987.** *Epidemiol Bull*, 1989; 10(1):1-8.
- PAHO (Pan American Health Organization). **Re-emergence of dengue in the Americas.** *Epidemiol Bull*, 1997; 18 (2): 1-7.
- Paudel D, Jarman R, Limkittikul K, Klungthong C, Chamnanchanunt S, Nisalak A, Gibbons R, Chojejjindachai W. **Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection.** *North Am J Med Scs*, 2011; vol. 3, n°. 10.
- Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. **Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design.** *Antiviral Res*, 2008; 80(1):11–22
- Pinheiro FP, Corber SJ. **Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas.** *World Health Stat Q* 50, 1997; 161–169
- Premaratna R, Bailey MS, Ratnasena BGN, de Silva HJ. **Dengue fever mimicking acute appendicitis.** *Transactions of the Royal Soc Trop Med and Hyg*, 2007; 101: 683-685.
- Prince HR, Yeh C, Lapé-Nixon M. **Utility of IgM/IgG Ration for Distinguishing Primary and Secondary Dengue Virus Infections Using Sera Collected More than 30 Days after Disease Onset.** *Clin Vaccine Immunol*, 2011; 18(11)1951.
- Qi RF, Zhang L, Chi CW. **Biological characteristics of Dengue virus and potential targets for drug design.** *Acta of Biochem Bioph*, 2008; 40(2): 91-101.
- QIAGEN. **Checklist for multiplex, real time PCR.** 2006. Disponível em: [www.qiagen.com/multiplex](http://www.qiagen.com/multiplex)
- Recker M, Blyuss KB, Simmons CP, Hien TT, Wills B, Farrar J, Gupta S. **Immunological serotype interactions and their effect on the epidemiological pattern of Dengue.** *Proc Biol Sci*, 2009; 276:2541-2548.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. **Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution.** *Science*, 1985; 229(4715):726–33.
- Richardson J, Molina-Cruz A, Salazar MI, Black W. **Quantitative analysis of Dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*.** *Am J Trop Med Hyg*, 2006; 74(1):132–141.
- Rico-Hesse R. **Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature.** *Virology*. 1990; 174(2):479-93.
- Rico-Hesse R. **Microevolution and virulence of Dengue viruses.** *Adv Virus Res*, 2003; 59: 315-341.
- Rico-Hesse R. **Dengue virus evolution and virulence models.** *Clin Infect Dis*. 2007; 44(11):1462-6.

- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, Mesa MTR, Nogueira RMR, Rosa AT. **Origins of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the Americas.** *Virology*, 1997; vol. 230, issue 2: 244–251.
- Rigau-Pérez JG, Ayala-López A, García-Rivera EJ, Hudson SM, Vorndam V, Reiter P, Cano MP, Clark GG. **The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998.** *Am J Trop Med Hyg*, 2002; 67(4):355-62.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. **Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.** *Anal Biochem*, 1997; 15, 245(2):154-60.
- Rodenhuis-Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. **Function importance of Dengue virus maturation: infectious properties of immature virions.** *J Gen Virol*, 2008; 89:3047-3051.
- Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei H-Y, Wilschut J, Smit JM. **Immature Dengue virus: a veiled pathogen?** *PLoS Pathogens*, 2010; 6:e1000718.
- Rodriguez-Tan RS, Weir MR. **Dengue: a review.** *Tex Med*, 1998; 94(10):53–9.
- Rose JB, Zhou X, Griffin DW, Paul JH. **Comparison of PCR and Plaque Assay for Detection and Enumeration of Coliphage in Polluted Marine Waters.** *Appl Environ Microbiol*, 1997; 63(11): 4564–4566.
- Rosen L, Khin MM, U T. **Recovery of virus from the liver of children with fatal dengue: reflections on the pathogenesis of the disease and its possible analogy with that of yellow fever.** *Res. Virol*, 1989; 140(4):351–60.
- Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. **The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks.** *Am J Trop Med Hyg*, 1954; 3:878-882.
- Rothman AL. **T lymphocyte responses to heterologous secondary Dengue virus infections.** *Ann NY Acad Sci*, 2009; 1171(Suppl. 1):E36-41.
- Sa-Ngasang A, Anantapreecha S, A-Nuegoonpipat A, Chanama S, Wibulwattanakit S, Pattanakul K, Sawanpanyalert P, Kurane I. **Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay.** *Epidemiol Infect*, 2006; 134:820–825.
- Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckenoghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J. **Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent Dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial.** *Lancet*, 2012; 380(9853):1559-67.
- San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckenoghe A, Dayan GH, Guzman MG. **The epidemiology of Dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality.** *Am J Trop Med Hyg*, 2010; 82:128-135.
- Sanchez V, Gimenez S, Tomlinson B, Chan PK, Thomas GN, Forrat R, Chambonneau L, Deauvieau F, Lang J, Guy B. **Innate and adaptive cellular immunity in flavivirus-naïve human recipients of a live-attenuated Dengue serotype 3 vaccines produced in Vero cells (VDV3).** *Vaccine*, 2006; 24:4914-4926.



- Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. **An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1986; 81(2):245–6.
- Schilling S, Ludolfs D, Na LV, Schmitz H. **Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection.** J Clin Virol, 2004; 31:179–184.
- Schlesinger JJ, Foltzer M, Chapman S. **The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice.** Virology, 1993; 192(1):132–41.
- Senior K. **Dengue vaccine efficacy trials in progress.** Lancet Infect, 2009; 9:662-663.
- Shepard DS et al. **Cost-effectiveness of a pediatric dengue vaccine.** Vaccine, 2004; 22:1275–1280.
- Shrestha B, Brien JD, Sukupovi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, Kim T, O'Brien KM, Nelson CA, Johnson S, Fremont DH *et al.* **The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of Dengue virus type 1.** PLoS Pathogens, 2010; 6:e1000823.
- Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. **Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein S1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections.** Clin Diagn Lab Immunol, 2003; 10:622–630.
- Sierra B, Alegre R, Pérez AB, García G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, Aguirre E, Mayling Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Valdés L, Kanki P, Guzmán G. **HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of Dengue 2 disease: Advantages of the Cuban population for HLA studies of Dengue virus infection.** Hum Immunol, 2007; 68: 531–540.
- Simasathien S, Thomas SJ, Watanaveeradej V, Nisalak A, Barberousse C, Innis BL, Sun W, Putnak JR, Eckels KH, Hutagalung Y *et al.* **Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated Dengue vaccine in flavivirus naïve children.** Am J Trop Med Hyg, 2008; 78:426-433.
- Simmons CP, Farrar J. **Changing patterns of Dengue epidemiology and implications for clinical management and vaccines.** PLoS Med, 2009; 9:e1000129.
- Stocks CE, Lobigs M. **Signal Peptidase Cleavage at the Flavivirus C-prM Junction: Dependence on the Viral NS2B-3 Protease for Efficient Processing Requires Determinants in C, the Signal Peptide, and prM.** J Virol, 1998; 72(3):2141–9.
- Suaya JA, Shepard DS, Siqueira JB, Martelli CT, Lum LC, Tan LH, Kongsin S, Jiamton S, Garrido F, Montoya R *et al.* **Cost of Dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study.** Am J Trop Med Hyg, 2009; 80:846-855.
- Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Purtha WE, Oliphant T, Nybakken GE, Schlesinger JJ, Roehrig JT, Gromowski GD, Barrett AD, Fremont DH *et al.* **Type and subcomplex specific neutralizing antibodies against domain III of Dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes.** J Virol, 2007; 81:12816-12826.
- Sun W, Cunningham D, Wasserman SS, Perry J, Putnak JR, Eckels KH, Vaughn DW, Thomas SJ, Kanesa-Thanan N, Innis BL *et al.* **Phase 2 clinical trial of three formulations of**

- tetravalente live-attenuated Dengue vaccine in flavivirus-naïve adults.** *Hum. Vaccines.* 2009, 5:33-40.
- Sun W, Nisalak A, Gettayacamin M, Eckels KH, Putnak JR, Vaughn DW, Innis BL, Thomas SJ, Endy TP. **Protection of rhesus monkeys against Dengue virus challenge after tetravalent live attenuated Dengue virus vaccination.** *J Infect Dis,* 2006; 193:1658-1665.
- Tan CH, Yap EH, Singh M, Deubel V, Chan YC. **Passive protection studies in mice with monoclonal antibodies directed against the non-structural protein NS3 of dengue 1 virus.** *Gen Virol,* 1990; 71(3):745–9.
- Tomashek KM, Margolis HS. **Dengue: a potential transfusion-transmitted disease.** *Transfusion,* 2011; vol. 51, issue 8: 1654–1660.
- Tambyah PA, Koay ESC, Poon MLM, Lin RVTP, Ong BKC. **Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion.** *N Engl J Med,* 2008; 359(14):1526–7.
- Tapia-Conyer R, Méndez-Galván JF, Gallardo-Rincón H. **The growing burden of Dengue in Latin America.** *J Clin Virol,* 2009; 46(Suppl. 2):S3-6.
- Toledo GL, Ovale II. **Estatística Básica.** 2ª Ed. Ed. Atlas S.A. 1995.
- Tomashek KM, Margolis HS. **Dengue: a potential transfusion-transmitted disease.** *Transfusion,* 2011; 51(8):1654-1660.
- Torres JR, Castro J. **The health and economic impact of Dengue in Latin America.** *Cadernos de Saúde Pública,* Rio de Janeiro, 2007; 23(1): S23-S31.
- Valasek MA, Repa JJ. **The power of real-time PCR.** *Adv Physiol Educ,* 2005; 29: 151–159.
- Vasconcelos PFC.. **Yellow fever.** *Rev Soc Bras Med Trop,* 2003; 36(2):275-293.
- Vasilakis N, Cardosa J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. **Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic Dengue virus and its impact on public health.** *Nat. Rev Microbiol,* 2011; 9(7):532–41.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. **Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses.** *J Infect Dis,* 1997; 176:322–330.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. **Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity.** *J Infect Dis.* 2000; 181(1):2 - 9.
- Vázquez S, Cabezas S, Pérez AB, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, Bernardo L, Castro O, González D, Serrano T, Sanchez A, Guzmán MG. **Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections.** *Int J Infect Dis,* 2007; 11:256–262.
- Veronesi R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias.** 8ª Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 1991.
- Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Brunner H, Bernhagen J. **A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system.** *Anal Biochem,* 1999; 276(1): 59-64.

- Wahala WMPB, Donaldson EF, de Alwis R, Accavitti-Loper MA, Baric RS, de Silva AM. **Natural strain variation and antibody neutralization of Dengue serotype 3 viruses.** PLoS Pathogens, 2010; 6:e1000821.
- Wahala WMPB, Kraus AA, Haymore LB, Accavitti-Loper, de Silva AM. **Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III – reactive antibody.** Virology, 2009; 392:103-113.
- Wang E, Ni H, Xu R, Barrett ADT, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. **Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses.** J Virology. 2000; 74(7):3227 - 34.
- Wearing HJ, Rohani P. **Ecological and immunological determinants of dengue epidemics.** Proc Natl Acad Sci USA, 2006; 103(31): 11802-7.
- Weaver SC, Vasilakis N. **Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease.** Inf Gen Evol. 2009; 9(4):523-40.
- Welsh RM, Rothman AL. **Dengue immune response: low affinity, high febrility.** Nat Med, 2003; 9:820-822.
- Werme K, Wigerius M, Johansson M. **Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferonstimulated JAK-STAT signalling.** Cell Microbiol, 2008; 10:696–712
- Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SYa, Horzinek MC, Igarashi A, Kääriäinen L, et al. **Flaviviridae.** Intervirology, 1985; 24(4):183–92.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. **Prospects for a dengue virus vaccine.** Nature Revs Microb, 2007; 5(7):518–28.
- Whitehorn J, Farrar J. **Dengue.** Br Med Bull, 2010; 95:161-173.
- Wikramaratna PS, Simmons CP, Gupta S, Recker M, Schneider BS. **The Effects of Tertiary and Quaternary Infections on the Epidemiology of Dengue.** PloS one. 2010; 5(8):12347.
- Wilder-Smith A, Chen LH, Massad E, Wilson ME. **Threat of Dengue to blood safety in Dengue-endemic countries.** Emerg Infect Dis, 2009; 15(1):8–11.
- Wong ML e Medrano JF. **Real-time PCR for mRNA quantitation.** Biotechniques, 2005; 39(1):75-85.
- World Health Organization. **Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control – New Edition.** 2009.
- Yamshchikov VF, Compans RW. **Formation of the flavivirus envelope: role of the viral NS2B-NS3 protease.** J Virol, 1995; 69(4):1995-2003.
- Yamshchikov VF, Trent DW, Compans RW. **Upregulation of signalase processing and induction of prM-E secretion by the flavivirus NS2B-NS3 protease: roles of protease components.** J Virol, 1997; 71(6):4364–71.
- Young P. **Searching for the Dengue virus Achilles heel.** Microbiol Australia, 2010.
- Zhang YM, Corver J, Chipman PR, Pletnev SV, Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG. **Structures of immature flavivirus particles.** J EMBO, 2003; 22:2604–2613.

Zhang YM, Hayes EP, McCarty TC, Dubois DR, Summers PL, Eckels KH, Channock RM, Lai C. **Immunization of mice with dengue virus structural proteins and nonstructural protein NS-1 expressed by baculovirus recombinant induces resistance to dengue virus encephalitis.** J Virology, 1988; 62:3027-3031.