

ADRIANA DE SOUZA ANDRADE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA O
VÍRUS DA DENGUE TIPO 4.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Silvia Inês Sardi

Co-orientadora: Dra. Lilia Ferreira Moura Costa

SALVADOR

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

A553 Andrade, Adriana de Souza.

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais para o vírus da dengue tipo 4 / Adriana de Souza Andrade. - Salvador, 2015.

79 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Inês Sardi.

Coorientadora: Profa. Dra. Lilia Ferreira Moura Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

1. Vírus da dengue. 2. Hibridomas. 3. Anticorpos monoclonais. 4. Proteínas de membrana. I. Sardi, Silvia Inês. II. Costa, Lilia Ferreira Moura. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 604

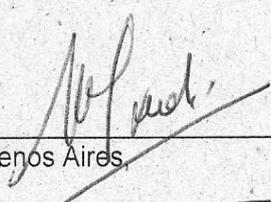
ADRIANA DE SOUZA ANDRADE

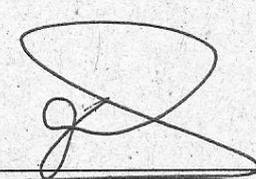
**Produção e caracterização de anticorpos monoclonais
para o vírus da Dengue tipo 4**

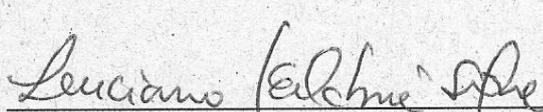
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 28 de abril de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Silvia Ines Sardi – Orientadora 
Doutora em Virologia pela Universidad de Buenos Aires,
UBA, Argentina.
Universidade Federal da Bahia

Fernanda Washington de Mendonça Lima 
Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz,
FIOCRUZ, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Luciano Kalabric Silva 
Doutor em Patologia Humana pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Fundação Oswaldo Cruz

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Neuza Neves e a Prof^a Dra Camila Figueirêdo pelo auxílio prestado, de fundamental importância para a realização desse estudo.

Ao Hospital Aliança pelas amostras sorológicas cedidas.

À CAPES pelo apoio financeiro e viabilização desse estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e aos professores pela convivência e ensinamentos.

Aos meus orientadores, Prof^a Dra Silvia Sardi, Prof^a Dra Lilia Costa e Prof. Dr. Gúbio Campos pelo privilégio de suas orientações, confiança e dedicação, além da possibilidade da realização de um projeto de mestrado que me estimulava e me encantava todos os dias.

Em especial a minha orientadora Dra Silvia Sardi, pelo grande companheirismo, principalmente nos momentos de dificuldades na realização desse trabalho, e por todos os ensinamentos compartilhados.

À todos os meus colegas de laboratório por tornarem meus dias mais alegres, pela cumplicidade e apoio em todos os momentos. Agradeço em especial a Dellane Tigre, Juliana Torres e Madina Lyve pela imensa presença durante essa caminhada, e pela amizade que construímos.

Aos meus colegas de mestrado, muitos dos quais hoje chamo de amigos, obrigada pela nossa união e cumplicidade. Sentirei muitas saudades de todos, mas levo a alegria de vê-los seguindo um lindo caminho pela frente, e espero nos encontrarmos adiante.

Ao prof. Cleuber Fontes por seu apoio, incentivo e amizade em momentos decisivos, e que muito me ajudou nesse caminho.

À minha família, em especial à minha mãe Jacilene, irmão Adriano e companheiro Gustavo, pilares da minha vida.

E por fim, a Deus por ter tornado tudo possível, e por ter me trazido exatamente para onde eu amo estar!

ANDRADE, Adriana de Souza. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais para o vírus da dengue tipo 4. 2015, 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RESUMO

O vírus da dengue (DENV) é um arbovírus pertencente à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, apresentando quatro sorotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. No Brasil, a infecção pelo DENV-4 ressurgiu em 2010, após 31 anos, expondo a população ao alto risco de desenvolvimento da dengue grave, devido à co-circulação dos quatro sorotipos. Nesse contexto, os anticorpos monoclonais (AcM) apresentam-se como uma ferramenta importante devido à sua potencial aplicação como ferramenta biotecnológica. O objetivo deste trabalho foi a produção e caracterização de AcM contra DENV-4. A metodologia para a produção de AcM foi desenvolvida por Köhler e Milstein (1975). Resumidamente, os animais de experimentação foram hiperimunizados com antígeno viral DENV-4, obtidos a partir da multiplicação do vírus em células de cultura C6/36, e subsequente concentração e precipitação com polietilenoglicol 8000. A triagem dos sobrenadantes dos hibridomas para reatividade ao DENV-4 foi realizada pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA), e a caracterização dos AcM foi realizada pelas técnicas de ELISA, *Dot-Blot*, Imunofluorescência Indireta (IFI), *Western-Blot*. Um total de dez hibridomas foram obtidos e os AcM produzidos foram denominados A2, B1, B4, C11, D2, E4, F10, F12, H1, H12. Os AcM apresentaram diferentes perfis de reatividade frente aos diversos testes de detecção antigênica, demonstrando um reconhecimento direcionado principalmente para prM. Em conclusão, este estudo mostra o potencial de utilização dos AcM produzidos como insumo biotecnológico; sejam em estudos a respeito do vírus e sua patogênese, sejam em uma possível aplicação como ferramenta imunodiagnóstica.

Palavras-chave: Vírus Dengue, DENV-4, Hibridomas, Anticorpos Monoclonais, prM.

ANDRADE, Adriana de Souza. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais para o vírus da dengue tipo 4. 2015, 76 f. 2015, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ABSTRACT

Dengue virus (DV) is an arbovirus belonging to family Flaviviridae, genus *Flavivirus*, with four serotypes named DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. In Brazil, the infection by DENV-4 reemerged in 2010 after 31 years, exposing the population at high risk for developing severe diseases because of the co-circulation of the four serotypes. The monoclonal antibodies (AcM) are important tools due to its potential application in biotechnology. The aim of this work was to produce and to characterize of AcM against DENV-4. The methodology to produce AcM was developed by Köhler and Milstein (1975). Briefly, experimental animals were hyperimmunized with DENV-4 viral antigen obtained to virus multiplication in C6/36 culture cells and subsequent concentration and precipitation with polyethylene glycol 8000. ELISA test was performed to screen hybridoma supernatants for reactivity to DENV-4, and the characterization of AcM was performed by ELISA, Indirect Immunofluorescence (IFI), *Dot-Blot* and *Western-Blot* techniques. A total of ten hybridomas were obtained producing AcM named A2, B1, B4, C11, D2, E4, F10, F12, H1 and H12. AcM showed different reactivity profiles in the tests, showing a dominant recognition to prM. In conclusion, this study shows the potential use of AcM produced as biotechnology tool; to study the virus and its pathogenesis, or a possible application in immunodiagnostic assays.

Keywords: Dengue Virus, DENV-4, Hybridomas, Monoclonal Antibodies, prM

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do risco global de dengue em 2012.....	17
Figura 2. Casos prováveis e internações por dengue/ Febre Hemorrágica da Dengue no Brasil no período entre 1986 a junho de 2013.....	16
Figura 3. Representação estrutural da partícula do DENV.....	18
Figura 4. Rearranjo estrutural das proteínas de superfície no processo de maturação viral.....	19
Figura 5. Processo de tradução e processamento da poliproteína viral.....	20
Figura 6. Estrutura dimérica da proteína E e seus domínios.....	22
Figura 7. Ciclo de replicação do DENV no interior da célula hospedeira.....	26
Figura 8. Mecanismos de intensificação da infecção viral dependente de anticorpos (ADE).....	29
Figura 9. Produção de anticorpos monoclonais através da técnica de hibridomas.....	33
Figura 10. Figura esquemática das vias de biossíntese metabólica dos nucleotídeos, e bloqueio da via “ <i>de novo</i> ” pela aminopterina.....	34
Figura 11. Desenho experimental do processo de produção e caracterização dos AcM.....	41
Figura 12. Efeito citopático em células C6/36 infectadas com o DENV-4.....	52
Figura 13. Desenvolvimento dos hibridomas.....	53
Figura 14. Titulação dos AcM frente ao ensaio no modelo ELISA Indireto.....	54
Figura 15. Ensaio <i>Dot-Blot</i> realizado para 10 AcM.....	55
Figura 16. Ensaio de imunofluorescência Indireta utilizando células C6/36.....	56
Figura 17. <i>SDS-PAGE</i>	58
Figura 18. <i>WESTERN-BLOT</i>	59
Figura 19 Aplicação dos AcM. Ensaio de imunofluorescência Indireta utilizando células C6/36.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcM - Anticorpos Monoclonais

ADE- Intensificação da infecção viral dependente de anticorpo

CRYO-EM - microscopia crio-eletrônica

CTLs - Linfócitos T Citotóxicos

D.O - Densidade ótica

DAB - Diaminobenzidina

DC-SIGN - Dendritic-cell-specific

DENV- Vírus da Dengue

EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA- “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”- Ensaio de imunoadsorção enzimática

FD - Febre da Dengue

FHD/SCD - (Febre hemorrágica da Dengue / Síndrome do Choque da Dengue)

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

HAT- Hipoxantina, Aminopterina e Timidina

HLA - “humam leukocyte antigen”- Antígeno Leucocitário Humano

ICAM3- Molécula de adesão “grabbing non-integrin”

IFI - Imunofluorescência Indireta

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IL-10- interleucina 10

JEV- encefalite japonesa

kDa - Kilodaltons

M - Molar

MEM-E - Meio Essencial Mínimo-Eagle

MHC- Complexo de Histocompatibilidade Principal

mM - Milimolar

BRASIL- Ministério da Saúde

NK- Células natural killer

nm- Nanômetros

NS - Proteína Não Estrutural

PBS – Solução Salina tamponada com Fosfato

PEG- Polietilenoglicol

prM- proteína pré-membrana (prM)

PROTEÍNA E - Proteína do envelope viral (E)

PROTEÍNA M- Proteína de membrana (M)

RE- Retículo Endoplasmático

RNA- Ácido Ribonucleico

RNA fs+ - Ácido Ribonucleico de fita simples polaridade positiva

RPM- Rotações por minuto

RT-PCR- Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de Poliacrilamida contendo SDS

SFB- Soro fetal Bovino

SLEV- Vírus da encefalite de Saint Louis

TBEV- vírus da encefalite do carrapato

TLRs- “Toll-like receptors”- Receptores do tipo Toll

TMB -3, 3, 5,5-tetrametilbenzidina

TNF - fator de necrose tumoral

TRIS- Hidroxi-Metil-Aminocetano

URT - “untranslated regions” - regiões não traduzidas

WHO- Organização Mundial de Saúde

WNV -Vírus do Oeste do Nilo

YFV- vírus da febre amarela

μM - Micromolar

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	12
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Epidemiologia.....	14
2.2 O vírus da Dengue.....	18
2.2.1 Estrutura Viral.....	19
2.2.2 Organização Genômica	21
2.2.3 Proteínas Estruturais.....	22
2.2.4 Proteínas Não Estruturais	24
2.3 Ciclo de Transmissão.....	25
2.4 Ciclo Viral.....	26
2.5 Sintomatologia da Dengue.....	28
2.6 Patogênese.....	28
2.6.1 A Intensificação da infecção viral dependente de anticorpo (ADE).	29
2.6.2 Reatividade cruzada de células T de memória.	31
2.6.3 Fatores de virulência do DENV.	31
2.7 Resposta Imune ao DENV.....	31
2.8 A tecnologia da produção de hibridomas.....	33
2.9 Anticorpos Monoclonais e Dengue.....	36
3.0 JUSTIFICATIVA.....	40
4.0 OBJETIVOS	41
5.0 MATERIAIS E MÉTODOS	42
6.0 RESULTADOS	53
7.0 DISCUSSÃO.....	62
8.0 CONCLUSÕES.....	67
9.0 REFERÊNCIAS	68
10.0 ANEXOS.....	78

1.0 INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose que mais atinge a humanidade, em especial nas regiões tropicais e subtropicais no qual é endêmica. Estima-se que cerca de 50-100 milhões de infecções pelo vírus ocorrem por ano e que mais da metade da população mundial vive nas regiões afetadas (WHO, 2012; PITAKSAJAKUL et al., 2014). Entretanto, até o momento não existem vacinas ou terapias antivirais específicas disponíveis, o que faz das ações preventivas e do rápido diagnóstico as principais ferramentas para a redução da mortalidade e contenção da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO), 2012).

São conhecidos circulantes entre os humanos, quatro sorotipos do vírus, os DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que geram quadros clínicos idênticos (GUBLER, 1998). A sintomatologia mais comum é o quadro febril clássico da dengue (FD), podendo evoluir para as formas graves, com extravasamento de plasma e hemorragias, podendo levar ao choque e morte. As formas graves são a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a Síndrome do choque da dengue (SCD) (GUBLER, 1998, MARTINA, 2011).

No Brasil, após 31 anos sem ser identificado, resurgiu em 2010 o DENV-4, apresentando rápida dispersão na população. Em pouco tempo, o DENV-4 tornou-se o dominante, com o agravante que em algumas regiões do país passaram a circular os quatro sorotipos. Desde então, houve um aumento do potencial epidemiológico do vírus, trazendo grande preocupação à saúde pública, em especial pelo aumento dos riscos do desenvolvimento de casos graves da doença, já que os quadros FHD/SCD encontram-se altamente relacionados a uma segunda infecção por sorotipos distintos (FIGUEIREDO et al., 2008; SESAB, 2014; BRASIL, 2015).

Há muitas lacunas existentes no conhecimento sobre o vírus da dengue e sua patogênese, em especial no que se refere ao desenvolvimento dos casos graves da doença. Sabe-se que os casos graves são 40 vezes mais frequentes durante a infecção secundária, que na infecção primária e que alguns fatores como: raça, idade e genética [a exemplo do HLA (*humam leukocyte antigen*- Antígeno Leucocitário Humano), expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10)] parecem estar associados ao seu desenvolvimento (SILVA, et al., 2010; JULANDER et al., 2011).

Têm sido formuladas três principais hipóteses para explicar a patogênese da Dengue: a intensificação da infecção viral dependente de anticorpo (ADE), resposta de células-T exacerbada e os fatores de virulência do vírus, no entanto todas ainda em fase de melhor compreensão (JULANDER et al., 2011; MARTINA, 2011).

Nesse contexto, a produção de anticorpos monoclonais (AcM) mostra-se importante para diversas finalidades, podendo contribuir no preenchimento das lacunas existentes a respeito da relação vírus-hospedeiro e patogênese da dengue, além de apresentar-se como uma excelente ferramenta biotecnológica com diversas aplicações imunoterápicas e imunodiagnósticas (ANTÚNEZ et al., 2000). A tecnologia da produção de anticorpos monoclonais foi desenvolvida em 1975 pelos cientistas Köhler e Milstein, através da fusão de linfócitos B e células de mieloma, produzindo hibridomas produtores de AcM, representando um marco no desenvolvimento técnico-científico mundial (SANTOS et al., 2006; MORAES et al., 2008). Tendo em vista o potencial de utilização desses AcM e suas possíveis aplicações no contexto da dengue, o objetivo desse estudo foi produzir e caracterizar anticorpos monoclonais para o DENV-4.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia.....

A dengue é uma doença de etiologia viral com rápida propagação, representando uma das principais preocupações de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais no qual é endêmica. Trata-se da mais comum arbovirose que atinge a humanidade, transmitida principalmente pelas fêmeas de mosquitos infectados do gênero *Aedes*, em especial o *Aedes aegypti*, uma espécie sinantrópica (NATAL, 2002; FIGUEIREDO, 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde, nos últimos 50 anos, houve um aumento de 30 vezes na taxa global da doença. Estima-se que cerca de 50-100 milhões de infecções pelo vírus ocorram por ano e que quase metade da população mundial vive nas regiões onde a dengue é endêmica, como pode ser visualizado na Figura 1 (WHO, 2012, PITAKSAJAKUL et al., 2014). Até o momento, circulam no mundo quatro sorotipos do vírus, que são mantidos no meio ambiente através de ciclos silvestres e urbanos. O ciclo silvestre ocorre pela circulação do vírus em primatas não humanos e mosquitos silvestres, enquanto que o ciclo endêmico ocorre nos ambientes urbanos, no qual o mosquito adaptado ao ambiente domiciliar, dissemina o DENV (VASCONCELOS et al., 1998; WEAVER 2009).

A propagação geográfica dos vetores no final do século XX conduziu a uma ressurgência global da dengue epidêmica, com a emergência dos casos de FHD/ SCD e zonas de hiperendemicidade em centros urbanos (GUBLER, 1998). Diversos fatores contribuíram para as recorrentes epidemias de dengue, dos quais pode-se citar o rápido crescimento demográfico associado à urbanização desordenada, a precária infraestrutura das cidades, o descarte inadequado dos resíduos urbanos, a debilidade nos serviços públicos e a baixa conscientização da população para o controle da proliferação do vetor (GUBLER, 1998; BARRETO, et al. 2008).

Nas Américas, desde 1960 a dengue tem se apresentado continuamente na população, sendo que nas últimas décadas há uma tendência crescente da incidência, com mais de 30 países notificando casos da doença. Apesar dos numerosos programas de erradicação do

mosquito vetor, os picos epidêmicos têm sido cada vez maiores, em períodos que se repetem a cada 3 a 5 anos, de maneira quase que regular (BRASIL, 2002 e 2011).

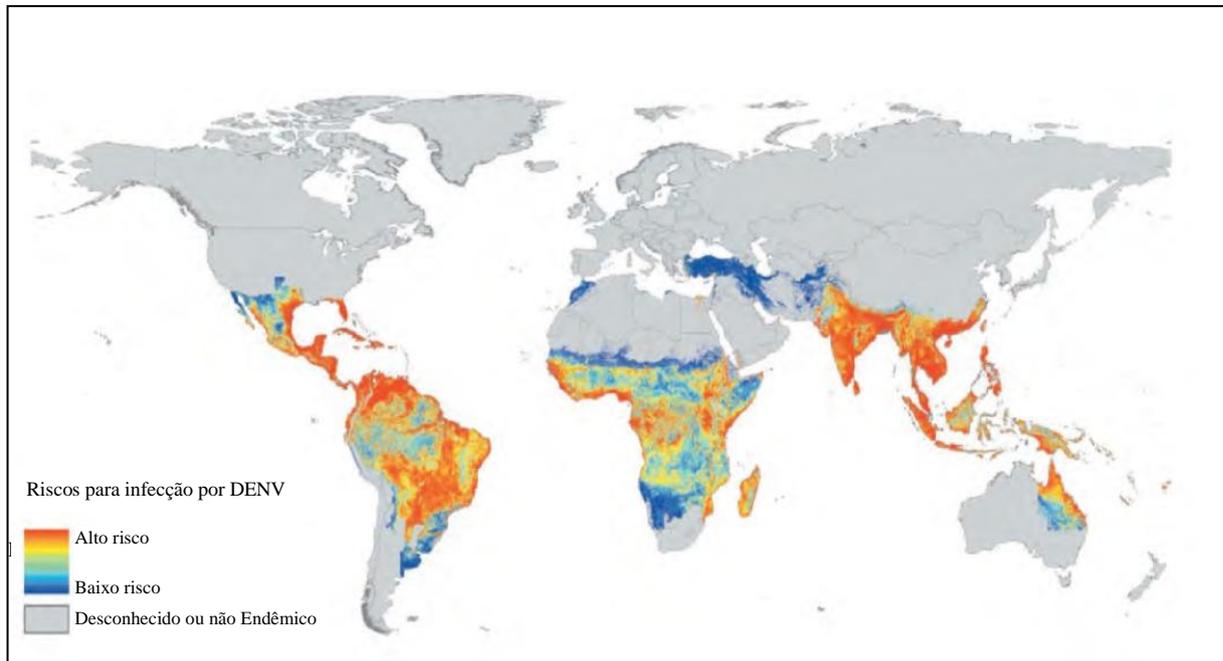


Figura 1. Distribuição do risco global de dengue em 2012. [Adaptada. Fonte: World Health Organization (WHO), 2012].

No Brasil, a primeira epidemia de dengue documentada data de 1981-1982, em Boa Vista (RR), causada pelos sorotipos 1 e 4. Desde então, a dengue se tornou uma preocupação constante de saúde pública no país, apresentando picos epidêmicos especialmente associados à introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes e/ou alteração do sorotipo predominante (BRASIL, 2002). No ano de 1990, o DENV-2 passou a ser o predominante na população, tendo sido inicialmente identificado no Rio de Janeiro, com posterior dispersão para os demais estados Brasileiros. Nessa década ocorreu um aumento significativo da incidência da dengue como consequência da dispersão do *Aedes aegypti* no território nacional, associada à mobilidade da população e expansão urbana (NOGUEIRA et al., 1990; 2001).

A circulação do DENV-3 foi identificada pela primeira vez no Brasil em 2000, no Rio de Janeiro, e em 2002 o vírus já havia se disseminado na população. Nesse período, uma das principais mudanças epidemiológicas foi o crescimento significativo da incidência da dengue frente aos anos anteriores, com um grande aumento nas formas graves da doença, justificado principalmente pela introdução do DENV-3 em co-circulação com o DENV-1, DENV-2 (LOURENCO-DE-OLIVEIRA, et al., 2002; BRASIL, 2002). No entanto, esse cenário ainda

estava por piorar, e em 2008 o Brasil apresentou uma das maiores epidemias de dengue registradas no país até o período, tendo como sorotipo predominante o DENV-2, havendo um crescimento dos casos graves e óbitos. Nesse período houve um aumento no número de casos e de hospitalizações em crianças, sendo evidente principalmente na região nordeste do país, quadro que desde então vem se mostrando como uma tendência no panorama epidemiológico da dengue (BRASIL, 2011).

Após 31 anos sem ser identificado, resurge no país em 2010 o DENV-4. O mesmo não era identificado em circulação no Brasil desde 1981, quando a Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, coordenada pelo Ministério da Saúde, o identificou no estado de Roraima. Ainda em 2010, o sorotipo viral foi identificado nos Estados do Amazonas, Pará, Piauí, Ceará, Bahia, e Rio de Janeiro. (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2011; NOGUEIRA et al., 2011; CAMPOS et al., 2015). Embora o DENV-4 ainda não tenha se tornado predominante no mundo, nos lugares onde ressurgiu, houve uma rápida substituição dos outros sorotipos, como no caso de ilhas no Pacífico, no Peru, na Índia, e atualmente no Brasil (FORSHEY B. M et al., 2009; LI et al., 2010; CECILIA et al.; 2010 DASH et al., 2011; CAMPOS et al., 2015).

O reaparecimento do vírus DENV-4 após 31 anos desperta preocupação na saúde pública do país, pois apesar da sintomatologia inicial da doença parecer ser a mesma para os quatro sorotipos, a população ainda não apresenta imunização natural para este sorotipo. Esse fato evidencia um alto potencial de disseminação do DENV-4, o que inclui um aumento dos riscos de desenvolvimento de casos graves da doença, já que o agravamento dos quadros clínicos encontra-se relacionado a uma segunda infecção por sorotipos heterólogos (GUBLER, 1998).

Em 2012, dados da vigilância epidemiológica já mostravam o sorotipo 4 como dominante, presente em 63% das amostras positivas, com o agravante de que em algumas regiões do país houve notificações de co-circulação dos quatro sorotipos da doença (FIGUEIREDO et al.,2008, SESAB,2014; BRASIL, 2015). Em 2013 o sorotipo 4 chegou a representar 71,9% em isolamentos virais ,e foram notificados 1.476.917 casos suspeitos de dengue, o que corresponde a um aumento de 54,6% em relação a 2010 (Figura 2).

Com relação ao ano de 2014, Dados do Ministério da saúde (2015) mostraram 547.612 casos suspeitos de dengue no país, uma redução de 59,3% em relação a 2013 (591.080 casos registrados); além de ter havido também uma redução nos casos graves e óbitos. No entanto,

regiões do sul do país, como Santa Catarina e Porto Alegre, que até então não haviam registrados casos autóctones da doença, passam a registrar seus primeiros casos de dengue (Secretaria do Estado de Saúde de Santa Catarina, 2014; Secretaria do Estado do Rio Grande do Sul, 2015). Em 2015, foram notificados até a semana epidemiológica (SE) 47 (04/01/15 a 28/11/15) 1.566.510 casos prováveis de dengue no país. Foram confirmados 1.515 casos de dengue grave e 19.472 casos de dengue com sinais de alarme. No mesmo período de 2014, foram confirmados 747 casos de dengue grave e 8.308 casos de dengue com sinais de alarme. Com relação ao número de óbitos, foram notificados 828 óbitos por dengue, o que representa um aumento no país de 79% em comparação com o mesmo período de 2014, quando foram confirmados 463 óbitos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015). Na Bahia, em 2014, foram notificados 24.314 mil casos de dengue, uma redução quando comparado a 2013, quando os números de registros chegaram 85.101 mil. Até a 14ª semana epidemiológica, referente ao mês de abril de 2015, foram notificados 13.680 mil casos suspeitos de dengue no estado, um aumento de 118,67% em relação ao mesmo período de 2014 (SESAB, 2015). Diante a história epidemiológica da dengue verificada até então, um novo panorama epidêmico pode estar prestes a ser visualizado no país, o qual a entrada do DENV-4 na população brasileira apresenta papel relevante, uma vez que eleva os riscos de infecção e em especial, de casos graves da doença.

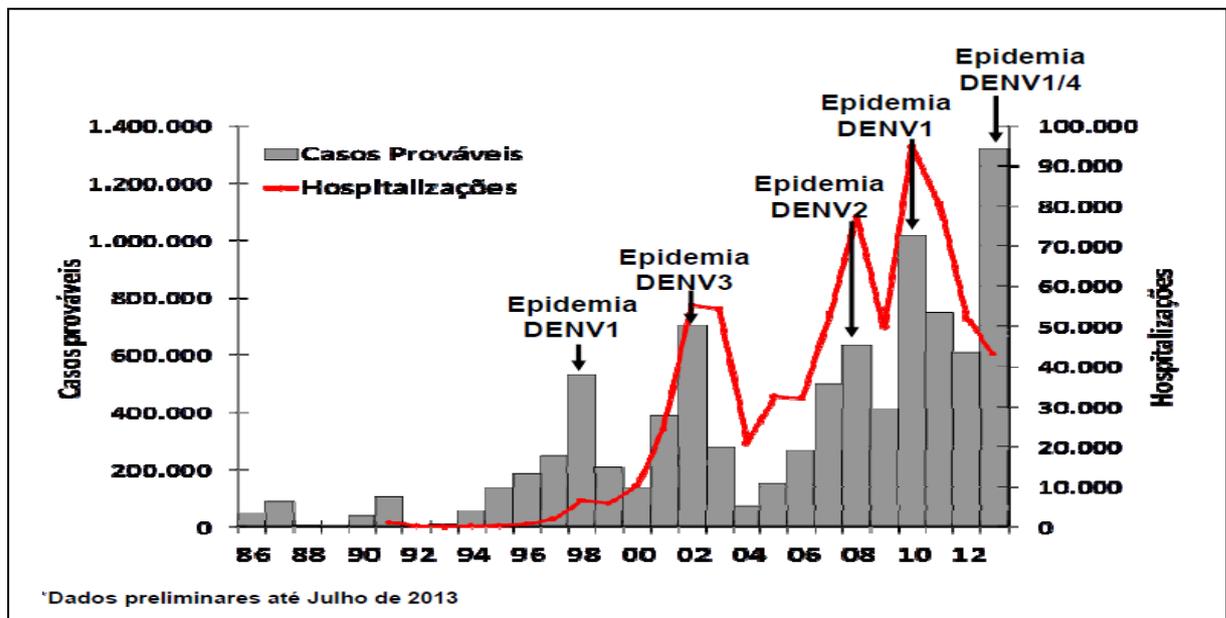


Figura 2. Casos prováveis e internações por dengue/ Febre Hemorrágica da Dengue no Brasil no período entre 1986 a junho de 2013. (Fonte: Secretaria de vigilância em Saúde; Barbosa, 2013).

Como não existem vacinas ou terapias antivirais específicas para o DENV, medidas preventivas apresentam-se fundamentais para a contenção e redução da morbidade/mortalidade (WHO, 2012). As medidas preventivas visam principalmente conter a propagação do vetor, seja evitando ou destruindo os criadouros através manejo ambiental, ou através do controle químico que consiste em tratamento focal (eliminação de larvas), ou “fumacê” (eliminação de alados). Além dessas medidas, ações governamentais como melhoria do saneamento básico e educação em Saúde da população mostram-se de extrema importância nesse combate, uma vez que podem atuar de forma chave no controle e desenvolvimento do vetor (BRASIL, 2002).

2.2 O vírus da Dengue.....

Pertencente ao gênero Flavivirus, o DENV e cerca de outros 70 vírus distintos integram a família Flaviviridae, dentre os quais também são patogênicos ao homem o vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da encefalite do carrapato (TBEV); vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) (MUKHOPADHYAY et al., 2005; GOULD et al., 2008).

Segundo descrito em Holmes et al. (2003), o DENV provavelmente se originou em regiões da Ásia e na África Ocidental, mantendo-se circulante em primatas não humanos. O crescimento populacional e a aproximação de áreas florestais propiciou a transmissão dos vírus ancestrais de primatas aos humanos, e após sucessivas mutações, deu origem aos diferentes sorotipos. São conhecidos quatro sorotipos do vírus circulantes em humanos; os DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, no entanto, em 2013 cientistas acreditam ter isolado o que poderia se tratar de um quinto sorotipo do vírus da dengue, mas até o momento, relacionado apenas aos ciclos silvestres (NORMILE, 2013; VOORHAM, 2014; MUSTAFA et al., 2014).

Os quatro sorotipos do vírus da dengue circulantes na população compartilham entre si aproximadamente 65% da sequência de nucleotídeos que compõem seus genomas, sendo antigenicamente distintos, apresentando variantes genéticas relacionados com a virulência e a procedência geográfica das infecções virais (HEINZ et al., 2000; RICO-HESSE, 2007; STROTTMANN, 2008). Apesar dessas variações, os quatro sorotipos circulam em um mesmo nicho ecológico e geram quadros clínicos idênticos da dengue no homem (GUBLER, 1998). A intensa exposição das populações humanas frente às diversas cepas virais traz

preocupações à saúde pública, pois favorecem o aumento da variabilidade genética e das variações entre as cepas, possibilitando inclusive um aumento da patogenicidade e infectividade do DENV, tendo como consequência, geração de maiores epidemias e introdução de novos tipos virais nos ciclos urbanos (HOLMES et al., 2003).

2.2.1 Estrutura Viral

O vírion é uma partícula esférica de aproximadamente 50nm de diâmetro, envolta por um envelope glicoproteico proveniente do brotamento viral no retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira (PERERA et al., 2008; BARTH, 2010). Esse envelope apresenta-se como uma bicamada lipídica no qual as proteínas do envelope viral (E) e proteínas de membrana (M) e pré-membrana (prM) encontram-se inseridas. Internamente a bicamada lipídica, há um nucleocapsídeo icosaédrico composto pela proteína estrutural do capsídeo (C), associada a uma molécula de RNA de fita simples e polaridade positiva (RNA fs+), de acordo com a Figura esquemática 3 (KUHN et al., 2002; PERERA et al., 2008; BARTH, 2010).

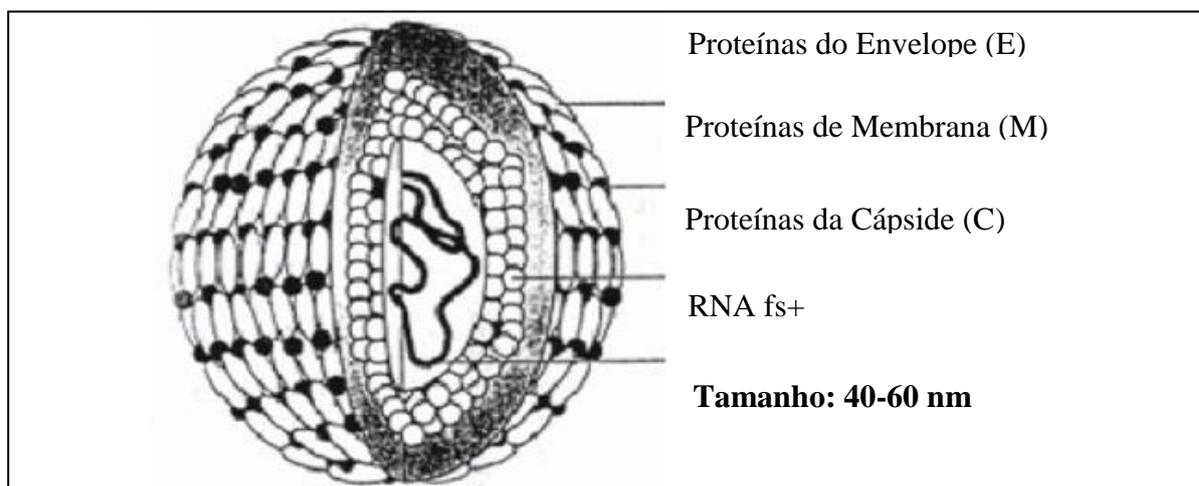


Figura 3. Representação estrutural da partícula do DENV. (Figura Adaptada. Fonte: CABEZAS, 2005).

A depender do processo de maturação do DENV, a proteínas E e a proteína prM/M apresentam diferentes conformações, conferindo características estruturais específicas às partículas maduras e imaturas (Figura 4-A) (LI et al., 2008; PERERA et al., 2008). No virion imaturo, as proteínas prM e E formam na superfície da partícula, 90 heterodímeros que se estendem como 60 pontos triméricos, sendo que a disposição espacial da proteína prM

impede a exposição prematura da proteína E. Já no vírus maduro, a proteína E é encontrada como 90 homodímeros, e o peptídeo “pr” da prM é então clivado, permanecendo apenas a fração M (Figura 4-B). Esse processo é acionado pela redução do pH (5,8-6,0) decorrente do trânsito da partícula viral através do retículo de Golgi, permitindo que nas a regiões próximas as membranas celulares, o vírus já constitua uma partícula infectiva (LINDENBACH ,2001; MUKHOPADHYAY, 2005; LI, et al., 2008; PERERA et al., 2008).

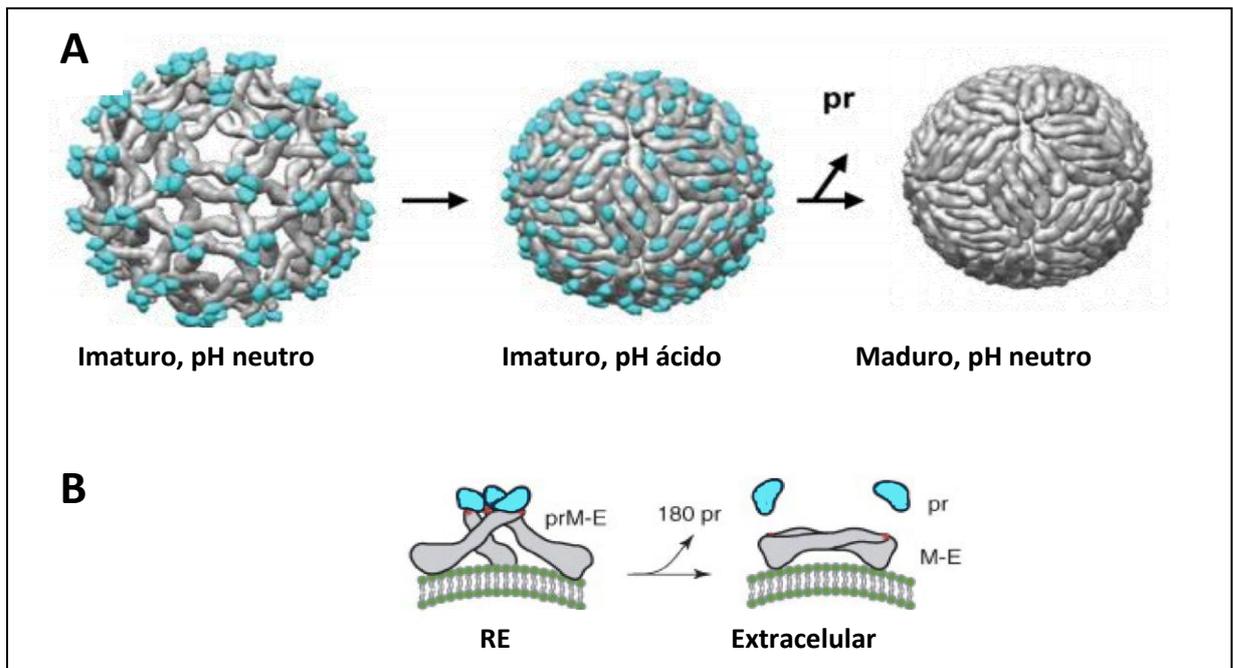


Figura 4. Rearranjo estrutural das proteínas de superfície no processo de maturação viral. (Figura adaptada. Fonte: PERERA et al., 2008; SHOCHAT et al.,2012). 4. A- Representação das proteínas prM e E na superfície viral, realizada através de mapas em cryo-EM (microscopia crio-eletrônica) , em diferentes pH. Em azul representa-se a “pr” (região glicosilada da proteína M) e em cinza, proteína E. Quando a partícula encontra-se no RE, em pH neutro, as proteínas prM-E foram um complexo trimero. Em baixo pH, durante o transporte pelo complexo de Golgi, ocorre um rearranjo proteico formando dímeros, e então a região pr do prM é clivada, formando o vírion maduro. 4. B- Visualização lateral dos trímeros de prM-E no envelope lipídico do vírus imaturo (esquerda) e estrutura dimérica em que se encontra o envelope no região extracelular (direita). A proteína M, não visualizada na Figura 4 (vírus maduro), encontra-se ancorada na membrana viral abaixo da proteína E.

2.2.2 Organização Genômica

O material genético do DENV é composto por uma fita simples RNA, polaridade positiva e aproximadamente 11.000 nucleotídeos de extensão. O genoma é dividido em regiões traduzidas (codificando as proteínas estruturais e não estruturais), CAP 5' e regiões não traduzidas (UTR- untranslated regions) 5' e 3' que se apresentam nas formas de grampos (*hairpin loops*) (CARVALHO, 2009). A região 5' não traduzida apresenta-se com aproximadamente 100 nucleotídeos com uma estrutura CAP (resíduo 7-metil-guanosina trifosfato). Diferentemente do mRNA (RNA mensageiro) celular, o genoma do DENV não apresenta uma cauda poliadenilada na extremidade 3' UTR (EDGIL et al., 2005; AZEVEDO, 2009; CARVALHO, 2009). Ambas as extremidades desempenham papel importante na iniciação, modulação da tradução e replicação do genoma viral, possibilitando a ciclização do RNA, necessária para a atividade eficiente da RNA polimerase viral dependente de RNA. O genoma apresenta uma única fase de leitura aberta que codifica uma poliproteína precursora com aproximadamente 3.400 aminoácidos, que será clivada co- e pós-traducionalmente por proteases virais e da célula hospedeira (PERERA, 2008; JULANDER, et al. 2011). Essa proteína precursora apresenta uma sequência sinalizadora que a direciona para o RE das células hospedeiras, se inserindo na membrana do RE, no qual será processada, originando então as proteínas estruturais e não estruturais (Figura 5).

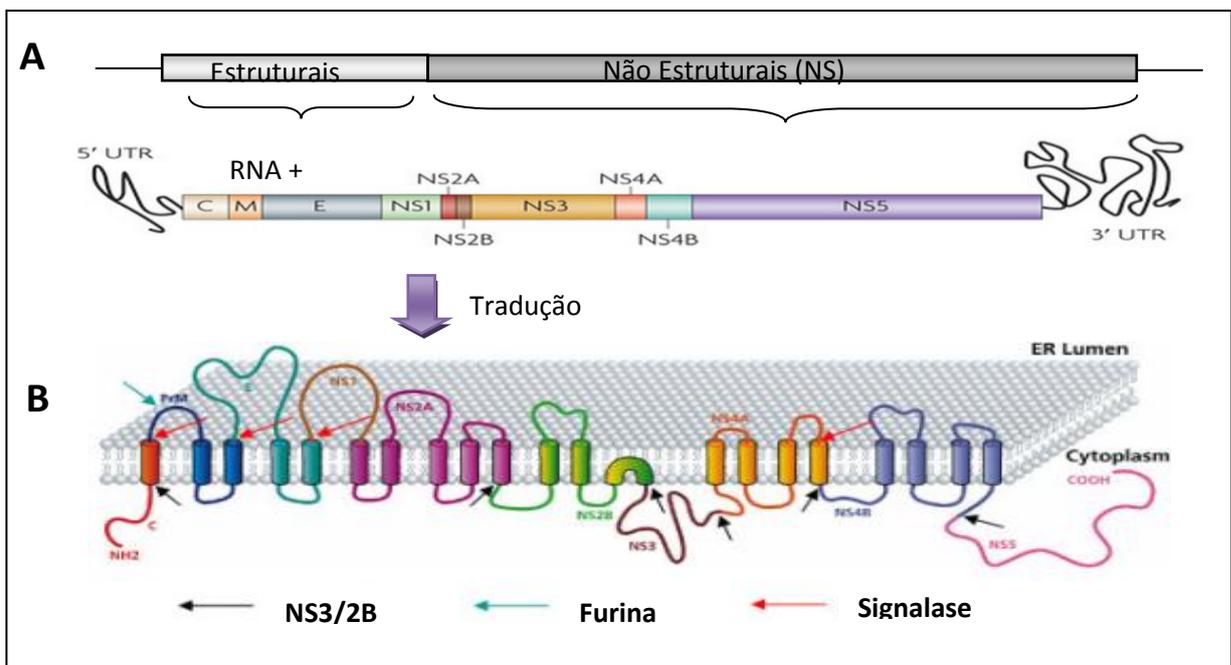


Figura 5. Processo de tradução e processamento da poliproteína viral. (Figura Adaptada.)

Fonte: UMAREDDY et al., 2007; GUZMAN et al., 2010). A-O genoma do DENV codifica as três proteínas estruturais (Capsídeo (C), membrana (M) e Envelope (E)) e sete proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5. B- Representação esquemática do processamento da poliproteína viral, durante o processo de maturação, por proteases do hospedeiro (Furina e Signalase) na região do lúmen do RE, e pelo complexo viral NS2B/NS3 e na região citoplasmática. Uma peptidase do hospedeiro é responsável pela clivagem nas regiões C/prM, prM/E, E/NS1, formando as proteínas C, prM e E, além da clivagem da proteína NS4A próxima da região carboxi-terminal. Já as junções das proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/NS4B e NS4B/NS são clivadas por uma serino protease, codificada pelo vírus, gerando as proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (MUKHOPADHYAY et al., 2005; LINDENBACH et al., 2007; AZEVEDO, 2009; SONG et al., 2014).

2.2.3 Proteínas Estruturais

A proteína de capsídeo (C) é essencial para a encapsidação do RNA genômico viral, sendo composta por 120 resíduos de aminoácidos, e peso molecular de aproximadamente 11 kDa (Kilodaltons) (LINDENBACH, 2003). É uma proteína básica, com as extremidades N e C-terminais apresentando cargas, e região medial hidrofóbica, esta última com importante função na interação com a membrana, na formação do envelope viral. Estudos indicam que a porção C-terminal também apresenta um domínio hidrofóbico na proteína recém-sintetizada cuja função está associada à sinalização para a translocação da prM no RE, sendo clivado posteriormente por uma serino protease. (LINDENBACH, 2001; WANG et al., 2004).

A prM, precursora da proteína M, é uma glicoproteína de peso molecular que varia de 19-26 kDa (AZEVEDO, et al. 2011). Tem como principal função impedir que a proteína E sofra um rearranjo em pH ácido para a forma fusogênica durante seu trânsito através da via secretora. Possivelmente também participa do processo de maturação da proteína E, sendo transportada através da via exocítica na forma de prM-E (WANG et al., 1999; SITTISOMBUT et al., 2006). Estudos sugerem que a precursora prM atue como uma chaperonina, auxiliando a montagem e enovelamento da proteína E (RAVIPRAKASH et al., 2000; LINDENBACH, 2003; GHOSH & DAR, 2015). O processamento da prM está relacionado a maturação dos vírions, sendo clivada por uma furina presente na célula hospedeira, durante seu transporte através do complexo de Golgi. O processo de clivagem se

dá no seguimento “pr”, na posição n-terminal que contem de um a três sítios de glicosilação e seis resíduos de cisteína, gerando então a porção M (8 kDa), que juntamente com a proteína E, encontram-se presentes no envelope lipídico do DENV maduro, formando a estrutura externa da partícula viral. (LINDENBACH, 2001, SITTISOMBUT et al., 2006).

A proteína E é o maior componente glicoproteico presente na superfície do viral, com peso molecular de aproximadamente 53 kDa (LINDENBACH, 2003). É a mais conservada dentre os flavivírus, e tem importantes funções, das quais destacam-se a montagem da partícula viral, ligação ao receptor celular, fusão do envelope com a célula hospedeira, além de tratar-se do principal alvo de anticorpos neutralizantes (CHAMBERS et al., 1990, LINDENBACH, 2003). Apresenta-se como uma proteína glicosilada que forma homodímeros, sendo que cada monômero é composto por três domínios distintos; o domínio I localizado na região central n-terminal da molécula, o domínio II, uma região em forma de dedo, possuindo em sua extremidade um “loop” de fusão, responsável pelo processo de dimerização dos monômeros da proteína E, e o domínio III, na porção C-terminal, responsável pela interação entre o vírus e a célula-hospedeira, promovendo a endocitose da partícula viral (Figura 6). (LINDENBACH, 2003; MODIS et al., 2004; WHITEHEAD, 2007.) Essa região tem sido bastante estudada pois alguns epítomos específicos mostraram-se capazes de induzir uma resposta protetora por anticorpos neutralizantes (JULANDER, et al. 2011; PITAKSAJAKUL et al., 2014,).

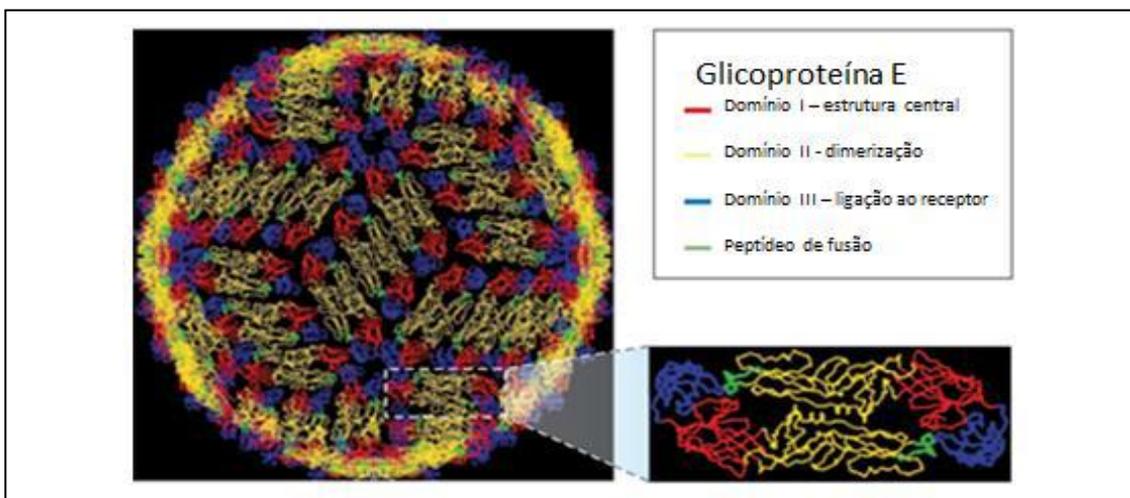


Figura 6. Estrutura dimérica da proteína E e seus domínios. (Apud: PINHO, 2013. Adaptado de WHITEHEAD, et al., 2007).

2.2.4 Proteínas Não Estruturais

A glicoproteína NS1 apresenta peso molecular de aproximadamente 45-48 kDa. Não constitui a estrutura da partícula viral infecciosa, e apresenta-se em 3 formas no organismo infectado: 1- Na forma secretada; 2- Na forma associada ao RE e 3- Associada a superfície celular (FLAMAND et al., 1999; LINDENBACH, 2003). A forma secretada é um importante alvo da imunidade humoral, fazendo dessa proteína um dos principais marcadores utilizados no diagnóstico precoce da dengue. As proteínas NS1 são encontradas em grandes quantidades nos soros dos pacientes infectados, e seus altos níveis têm sido relacionados com as formas graves da doença (YOUNG et al., 2000; LINDENBACH, 2003,).

Na forma associada ao RE, tem sido demonstrado que a NS1 encontra-se nas mesmas regiões onde há a presença das formas replicativas do RNA viral fita dupla, sugerindo uma possível atuação dessa proteína como cofator para replicação genômica (MACKENZIE et al., 1996; FLAMAND et al., 1999; LINDENBACH, 2003). E por fim, acredita-se que quando essa proteína encontra-se na forma associada à superfície celular, possa estar associada na transdução de sinal, envolvida nos processos de replicação, montagem e maturação viral (LINDENBACH, 2001).

Existem poucas informações a respeito das proteínas hidrofóbicas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B (XIE et al., 2014). Sabe-se que no interior celular, estas proteínas encontram-se associadas à membrana do RE, apresentando múltiplos seguimentos transmembranares. É possível que estejam associadas também às proteínas envolvidas no ciclo replicativo do DENV, além de estarem relacionadas a um mecanismo de escape viral, participando do mecanismo de bloqueio da via interferon (IFN) (MACKENZIE, 1998; UMAREDDY et al., 2006). Sabe-se que a NS2A apresenta peso molecular em torno de 22 kDa, com função no processamento da NS1, enquanto que a NS2B (14 kDa), em associação com a NS3, formam uma serino-protease ativa com a função de clivar as junções proteicas nas poliproteínas virais (LINDENBACH et al., 2007; UMAREDDY et al., 2007). Já a fração NS4A, com peso molecular de 16k kDa, parece estar relacionada a indução do rearranjo da membrana para a formação do complexo de replicação), enquanto que a NS4B, com aproximadamente 27kDa, está relacionada a modulação da replicação viral através da interação com a NS3 (LINDENBACH et al., 2007).

A NS3 apresenta peso molecular de aproximadamente 69-70 kDa, com atividade multifuncional de serino protease (NS2B-NS3), helicase (através da dissociação da dupla fita de RNA viral durante a replicação), de NTPase (hidrolizando ATP para os processos de replicação) e de RTPase (removendo o grupo fosfato da região 5' N-terminal ,envolvido no processo de adição da estrutura CAP na extremidade 5' UTR do genoma viral) (LINDENBACH et al., 2007; GEBHARD et al., 2014).

A NS5, proteína de peso molecular de 103 kDa, atua como RNA polimerase dependente de RNA, responsável pela replicação do RNA viral, apresentando também atividade de metiltransferase envolvida na adição do CAP 5' ao RNA mensageiro viral (LINDENBACH , 2003).

2.3 Ciclo de Transmissão.....

O ciclo de transmissão do DENV se inicia quando a fêmea do mosquito do gênero *Aedes* pica uma pessoa infectada. Em sequência, o vírus se multiplica no intestino médio e, após um período de 8 a 10 dias, passa a ser encontrado em outros tecidos como sistema nervoso e nas glândulas salivares (GUBLER et al., 2010). Uma vez infectado, o mosquito passa a transmitir o vírus para indivíduos suscetíveis, durante o repasto sanguíneo. Uma vez na circulação sanguínea de um novo hospedeiro humano, o vírus passa por um período de incubação, podendo variar de 3 a 14 dias para o aparecimento dos sintomas, até que passa a se multiplicar em células permissivas do organismo. (WHITEHEAD et al., 2007; HALSTEAD et al., 2008). A infecção primária no homem inicia-se nas células estriadas, lisas, fibroblastos e linfonodos locais, com a disseminação dos vírus para outras regiões do organismo pela corrente sanguínea (BARTH, 2010).

É conhecido que o DENV tem tropismo por um amplo espectro de células humanas, em especial células da linhagem fagocítica mononuclear (células dendríticas, monócitos/macrófagos, células de Langerhans), alvos principais da infecção (WU et al., 2000). No entanto, há evidências de que o vírus é capaz de infectar outras células como linfócitos B, linfócitos T, células “natural killer”, células endoteliais, hepatócitos e até neurônios (ANDERSON, 2003).

2.4 Ciclo de replicação viral.....

A interação inicial com a célula hospedeira se dá através da ligação de regiões da proteína E com receptores da superfície celular. Diversas moléculas têm sido descritas como possíveis receptores celulares, como o Heparan Sulfato, DC-SIGN [(*dendritic cell*)-*specific intercellular adhesion molecule ICAM-3-(grabbing nonintegrin)*], CD14, dentre outros (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010; PERERA-LECOIN, 2014). Após essa interação, ocorre a endocitose viral mediada por clatrin, e o transporte para o interior das células em vesículas endossomais. Essas vesículas apresentam pH ácido, o qual promove a dissociação dos dímeros da proteína E em monômeros, posteriormente formando trímeros irreversíveis, expondo então o peptídeo de fusão presente no domínio II. Esses trímeros de proteína E então se estendem em direção à membrana do endossomo, e se inserem na mesma, iniciando o processo de penetração do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira (MUKHOPADHYAY et al., 2005; LINDENBACH, 2007; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010)

Com a penetração do vírus no citoplasma, inicia-se o processo de desnudamento do genoma viral, no qual o nucleocapsídeo é desmontado e simultaneamente ocorre o início da replicação do RNA viral. O RNA *fs+*, passa a ser traduzido imediatamente nos ribossomos, atuando com fatores celulares ainda não totalmente elucidados do hospedeiro (CLYDE et al., 2006; LINDENBACH, 2007). Conjuntamente as primeiras traduções do RNA viral, ocorrem o processamento da poliproteínas nas membranas do RE, por uma signal-peptidase e uma serino proteinase contida na porção N-terminal de NS3 e por proteases celulares (MUKHOPADHYAY et al., 2005; UMAREDDY et al., 2007).

A proteína não estrutural NS5, que é uma RNA polimerase dependente de RNA, associa-se a NS3 e outras proteínas virais, para então produzir cópias de RNA viral polaridade negativa. A partir dessa fita negativa, ocorre a produção de novas fitas de RNA polaridade positiva a serem incorporadas como material genético nos novos vírions formados (LINDENBACH, 2007). Com a produção das proteínas virais, inicia-se o processo de montagem do DENV. As proteínas estruturais prM e E formam heterodímeros que se mantêm ancorados na face interna do RE enquanto o complexo de replicação viral (formado por RNA viral, proteínas virais e fatores da própria célula hospedeira) encontram-se ancorados na face externa das membranas do RE. A interação do RNA com as proteínas C formam o nucleocapsídeo que brotam em direção ao lúmen, adquirindo a bicamada lipídica com os

heterodímeros prM/E (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010, MACKENZIE, 2005) . A progênie viral é então transportada para o sistema de Golgi, período em que ocorre a clivagem da prM pela furina, processo responsável pelo rearranjo da superfície do vírion. A seguir, rompem-se os heterodímeros M/E e expondo o domínio de ligação III da proteína E formando uma partícula infectiva. Por fim, essas vesículas contendo as partículas infectivas são transportadas pelo mecanismo de exocitose até a membrana plasmática, liberando o vírus no ambiente extracelular (MUKHOPADHYAY et al.,2005; LINDENBACH , 2007; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

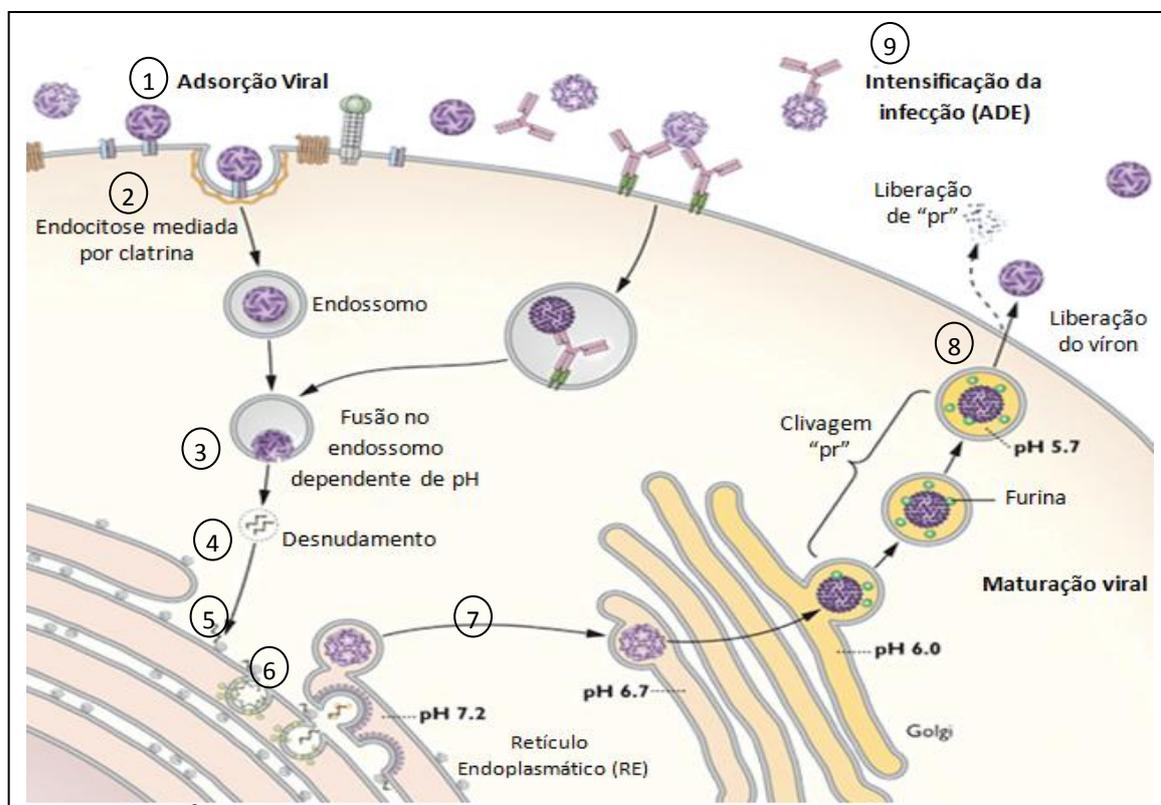


Figura 7. Ciclo de replicação do DENV no interior da célula hospedeira. Etapas: 1- Adsorção, 2-Penetração mediada por clatrina, 3- Fusão, 4-Desnudamento, 5-Tradução, 6-Replicação, 7-Montagem e 8- Brotamento. 9- Entrada mediada por anticorpos pelo mecanismo de intensificação viral (ADE). (Figura adaptada. Fonte: PIERSON, 2012. Disponível em: <http://www.niaid.nih.gov>).

2.5 Sintomatologia da Dengue.....

A Dengue pode apresentar-se em uma variedade de quadros clínicos, que vão desde uma doença febril sub-clínica ou assintomática até quadros graves, com extravasamento de plasma, podendo levar ao choque e à morte (GUBLER, 1998, MARTINA, 2011). A forma sintomática pode se estabelecer na forma febril clássica (FD), a qual geralmente cessa dentro de um período de 4 a 7 dias, sendo caracterizada por febre alta de início súbito, cefaleia, dor retro-orbital, náuseas, vômito, mialgia, artralgia, dor abdominal, calafrios e exantema (GLUBER, 1998). Nas formas graves, há um aumento na permeabilidade vascular, com extravasamento de plasma, ocasionada por uma “tempestade de citocinas” e trombocitopenia. Ambas são resultantes da resposta inflamatória à presença do vírus nas células do endotélio, favorecendo os quadros de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), e com a progressão do quadro, a síndrome do choque da dengue (SCD) (LEI, 2001, MARTINA 2011).

Devido ao aumento de casos graves no mundo e da dificuldade de se enquadrar a sintomatologia nos critérios de FHD, a o Ministério da Saúde, em 2009, atualizou a classificação dos níveis da doença em dengue sem sinal de gravidade ou dengue grave, de acordo com o estabelecido pela Organização Mundial de Saúde. Neste último insere-se os quadros de extravasamento e acúmulo de fluidos com desconforto respiratório, choque, hemorragias e envolvimento de órgãos, como nos casos de miocardite, hepatite e encefalite ocasionados pela infecção (VERDEAL et al., 2011, MARTINA, 2011).

2.6. Patogênese.....

Há muitas lacunas existentes na compreensão do DENV e sua patogênese, em especial no que se refere ao desenvolvimento dos casos graves da doença (LEI, 2001). É compreendido que se trata de um processo multifatorial, resultante da interação entre a resposta imunológica do hospedeiro e a virulência da cepa (MARTINA, 2011). Apesar dos mecanismos de agravamento da dengue não terem sido totalmente elucidados, não há dúvidas de que a genética do hospedeiro possa apresentar-se como um dos fatores na resistência ou suscetibilidade na doença grave. (YACOUB et al., 2013). Fatores genéticos como HLA

(Antígeno Leucocitário Humano), DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) –Grabbing Non-integrin*), fator de necrose tumoral (TNF- α), fator beta de transformação de crescimento (TGF- β 1) e interleucina 10 (IL-10), parecem estar associadas com a doença grave, assim como fatores de risco que incluem os extremos de idade, o sexo feminino, a etnia e as comorbidades como diabetes e hipertensão (SILVA, et al., 2010; JULANDER et al., 2011, MARTINA, 2011). No entanto, o maior fator de risco associado a evolução para a forma grave da doença é a infecção prévia por sorotipos heterólogos. Os casos de FHD/SCD são 40x mais frequentes durante a infecção secundária, que na infecção primária. Nesse sentido, as três principais hipóteses formuladas para explicar a patogênese da dengue são: a intensificação da infecção viral dependente de anticorpo (ADE); a reatividade cruzada de células T de memória, e os fatores de virulência do vírus (JULANDER et al., 2011; MARTINA, 2011).

2.6.1 A Intensificação da infecção viral dependente de anticorpo (ADE).

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que o aumento no risco de desenvolvimento de FHD/SCD, durante a infecção secundária por um sorotipo heterólogo, é principalmente devido ao fenômeno da ADE (CLYDE et al., 2006, LEI et al., 2001; JULANDER et al., 2011; PITAKSAJJAKUL et al., 2014). Esse fenômeno ocorre quando anticorpos ou fatores do complemento produzidos na primo-infecção opsonizam a partícula viral infectiva durante uma infecção subsequente, sem no entanto neutralizar o vírus. O anticorpo não neutralizante presente no soro reconhece o sorotipo heterólogo, e simultaneamente tem sua fração Fc γ reconhecida pelas células do sistema imune, tais como monócitos e macrófagos. Esse reconhecimento mútuo exacerba a infecção uma vez que essa ligação facilita o encontro com as células circulantes, e favorece a internalização dos vírus pelas células hospedeiras (Figura 8). (DEJNIRATTISAI et al., 2010; WAHALA et al., 2011; SAUTTO et al., 2013; SONG et al., 2014). Tem sido demonstrado que anticorpos de reação cruzada são dirigidos especialmente para as glicoproteínas E e para prM (DEJNIRATTISAI et al., 2010). O fenômeno da ADE representa-se como uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina, assim como para o desenvolvimento de imunoterapias seguras e eficazes para dengue (DEJNIRATTISAI et al., 2010).

Estudos recentes tem demonstrado que o fenômeno da ADE pode ocorrer por outros mecanismos independentes da ligação com a fração $Fc\gamma$. Anticorpos dirigidos contra proteínas virais seriam capazes de reagir de forma cruzada também com células do hospedeiro, ligando-se simultaneamente a ambos, e promovendo a aproximação necessária para a infecção (Figura 8-C). A presença de epítomos comuns entre células e vírus já foram sugeridas para as proteínas NS1, para os três domínios da proteína E e prM (FALCONAR et al., 2008, SAUTTO et al., 2013).

Um terceiro mecanismo associado à ADE que tem sido proposto constitui-se na alteração conformacional de proteínas da superfície da célula alvo, ocasionadas pela ligação dos anticorpos, melhorando a afinidade para os receptores celulares; e com isso a entrada do vírus (Figura 8-B) (SAUTTO et al., 2013).

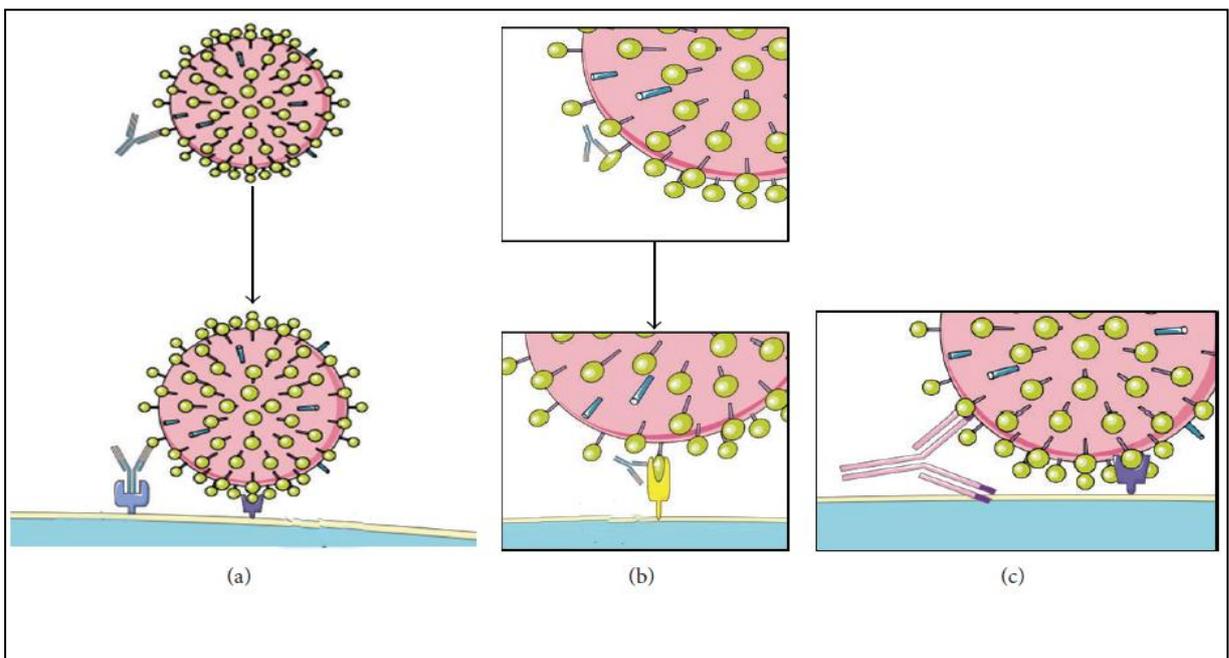


Figura 8. Mecanismos de Intensificação da infecção viral dependente de anticorpo (ADE). (Figura Adaptada: SAUTTO et al., 2013). a) Ligação do anticorpo à partícula viral e reconhecimento da fração $Fc\gamma$ pela célula alvo, favorecendo a infecção. b) Ligação do anticorpo e indução de alterações conformacionais, melhorando a afinidade para receptores celulares. c) Mimetismo molecular viral com reconhecimento mútuo viral/ célula hospedeira, aproximando ambos e favorecendo a infecção viral.

2.6.2 Reatividade cruzada de células T de memória.

Segundo essa hipótese, em infecções heterólogas ocorre uma ativação de linfócitos T de baixa afinidade, mas que reagem cruzadamente frente aos outros sorotipos, sendo ineficientes na eliminação do vírus. Dessa forma, há um aumento na viremia, e como consequência maior risco no desenvolvimento de FHD/ SCD. Respostas inapropriadas das células T têm sido observadas com alta frequência em pacientes com os sintomas graves da dengue, dando suporte a essa hipótese (MAZAROTO, 2009; JULANDER et al., 2011).

2.6.3 Fatores de virulência do DENV.

Acredita-se que as diferentes manifestações das formas graves da doença podem ser causadas por variantes do DENV com diferentes graus de virulência (LANCIOTTI et al., 1997). Dos quatro sorotipos circulantes, os DENV 2 e 3 têm sido associados com surtos mais graves da doença enquanto que os DENV 1 e 4 têm sido associados a quadros mais leves (RICO-HESSE, 2010; YACOUB et al., 2013). Dentre os sorotipos, há uma abundante variação genética, e cepas com divergências menores que 6% em suas sequencias foram agrupados em diferentes genótipos (RICO-HESSE, 1990). É possível que os genótipos também estejam relacionados com a patogenicidade do vírus. Um exemplo de genótipos com maior potencial de virulência se deu na substituição do DENV-2 circulante na América Latina por uma cepa Asiática, levando a um aumento dos casos graves (RICO-HESSE, 1997, YACOUB et al., 2013). Além disso, mutações nas regiões E e NS3 podem alterar a virulência viral provavelmente por aumentar a afinidade às proteínas receptoras das células hospedeiras, aumentando a eficiência da replicação viral (YACOUB et al., 2013).

2.7 Resposta Imune ao DENV.....

A imunidade duradoura induzida pela infecção do DENV é específica para o sorotipo infectante, e apesar de ser gerada uma resposta protetora cruzada entre os sorotipos heterólogos, essa proteção é de curta duração (WHITEHEAD et al., 2007).

A primeira linha de defesa contra o DENV se inicia com a produção de interferons (IFNs), moléculas que atuam interferindo na replicação viral e estimulando a atividade das células de defesa. Ao adentrar o organismo, a partícula viral é reconhecida por lectinas do tipo-C e TLRs (*toll-like receptors*- receptores do tipo toll), que são expressas por células de defesa. Foi observado que em pacientes com quadros clínicos leve da dengue há a ativação das células NK (natural killer), com a secreção de várias citocinas, incluindo IFN-1 e IFN-2, no entanto, altos níveis de IFN presente no soro de pacientes foram associados à doença grave (SHERESTA et al., 2005; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). Estudos recentes têm sugerido que algumas das proteínas não estruturais como a NS2A, NS4A, NS4B e NS5 atuam na inibição da resposta imune inata, inclusive na produção de IFN- α (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

Com o desenvolvimento da resposta imune humoral, que se dá após um período de aproximadamente sete dias, há uma predominância de anticorpos dirigidos para as proteínas estruturais E e prM/M e contra a proteína não estrutural NS1 (MAZZAROTO, 2009; SAUTTO, 2013). No entanto, os anticorpos neutralizantes são direcionados especialmente para a proteína E, bloqueando a ligação da partícula viral à célula hospedeira (DEJNIRATTISAI et al., 2010, JULANDER et al., 2011).

Os anticorpos contra as proteínas não estruturais não neutralizam a atividade viral, mas interferem no processo de multiplicação do patógeno. Anticorpos anti-NS1, nos casos em que as proteínas NS1 encontram-se ancoradas na superfície das células, apresentam a capacidade de mediar a lise de células infectadas, através da ativação do complemento. Quando em sua forma solúvel, a NS1 é capaz de ativar diretamente o complemento, produzindo o complexo C5b-9 solúvel, o que pode aumentar a permeabilidade de células endoteliais, estando, portanto, relacionados aos casos graves da doença. Tem sido descrito também a presença de um mimetismo molecular com proteínas endógenas do hospedeiro pela NS1, gerando uma resposta autoimune durante a infecção pelo vírus, associada ao comprometimento da integridade das células do endotélio e depleção de plaquetas, quadro característica da doença (FALCONAR et al., 1997; LEI, 2001).

A resposta celular envolve a ativação de células T, CD4+ e CD8+ específicas contra epítomos do vírus. A maioria desses epítomos estão presentes nas proteínas NS1, NS3 e E do vírus da dengue. Os linfócitos T *helper* atuam frente às células infectadas que expressem

receptores HLA tipo II, produzindo IFN γ , IL-2 e fatores de estimulação de macrófagos e granulócitos. Já os linfócitos citotóxicos atuam diretamente nas células infectadas que expressam receptores HLA tipo I, lisando-as (MONATH, 1997). Alguns fatores genéticos como o haplotipo HLA têm sido relacionados à gravidade dos casos, como já mencionado anteriormente.

2.8 A tecnologia da produção de hibridomas.....

Desenvolvido em 1975 pelos cientistas Köhler e Milstein, e merecedores do Prêmio Nobel de Medicina em 1984, a tecnologia para produção de células híbridas constituiu um marco no desenvolvimento científico, sendo de ampla utilização até os dias atuais (KÖHLER & MILSTEIN 1975; MATHER & ROBERTS, 1998; SUSCOVICH et al., 2015). Os hibridomas são linhagens celulares resultantes da fusão entre linfócitos B com células tumorais (mieloma), conservando características específicas importantes de ambas as células. Os linfócitos B (plasmócitos) são células produtoras de anticorpos, mas incapazes de serem mantidas em cultivos, uma vez que apresentam curto período de vida. Já as células mielômicas apresentam longa vida em cultivo com alta capacidade mitótica (células imortalizadas). Através da hibridização de ambas, gera-se uma célula capaz de produzir anticorpos específicos e de se manter e reproduzir indefinidamente (MATHER, 1998; NELSON, 2000).

Para a indução da resposta imune humoral e geração de anticorpos, inicialmente imuniza-se um animal, geralmente camundongo, com o antígeno desejado; e após o período de resposta imunológica, coletam-se os linfócitos B provenientes do baço (esplenócitos) ou linfonodos. Essas células são então misturadas às células de linhagem mielômica, e expostas a processos fusogênicos como a adição de PEG (polietilenoglicol) (Figura 9) (HUI et al., 1993; MATHER, 1998).

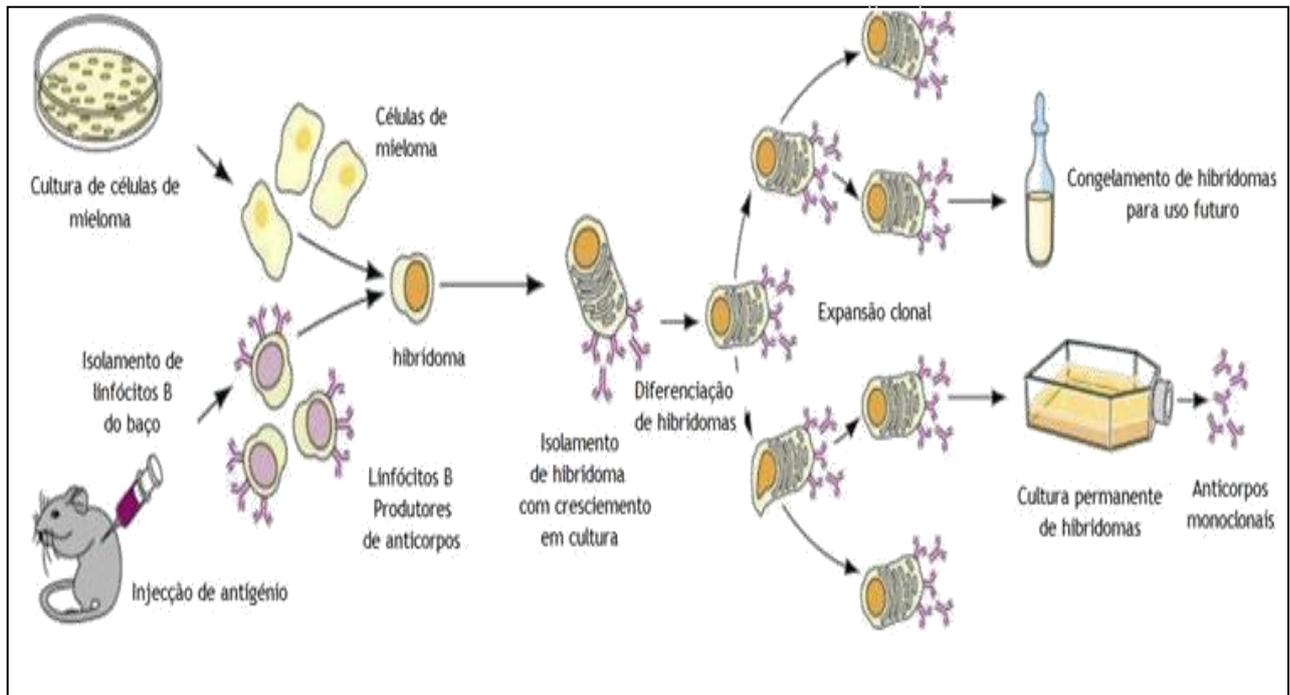


Figura 9. Produção de anticorpos monoclonais através da técnica de hibridomas. (fonte: www.lookfordiagnosis.com).

Após processo de fusão, é necessário eliminar as células que não se fundiram ou que se fundiram incorretamente, transferindo-as para uma solução contendo o HAT (Hipoxantina, Timidina e o antimetabólito Aminopterina). Este meio seleciona os hibridomas através da biossíntese metabólica de nucleotídeos e timidilatos, via responsável pela síntese de DNA, que em células normais é realizada por uma via metabólica denominada “*de novo*”. Essa via ocorre utilizando fosforibosil pirofosfato e uridilato, e em um dos passos dessa reação metabólica, há a transferência de um grupo metil ou formil de um tetrahidrofolato ativado. A adição de drogas anti-folatos, como a aminopterina inibem a reativação do tetrahidrofolato, bloqueando a continuidade da reação metabólica. Em células normais, uma segunda via para a produção de DNA é então ativada, denominada via “*de salvamento*”, no qual através das enzimas hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) e timidina quinase (TK), torna-se possível a utilização da hipoxantina e timidina na síntese de nucleotídeos (Figura 10) (ABBAS et al., 2008; MAZZAROTO, 2009; PANDEY et al., 2010). As células de linhagem mielômicas utilizadas na fusão são alteradas geneticamente de forma a não produzir HGPRT, enquanto a TK sintetizam purinas não funcionais e produtos letais a célula. De forma simplificada, a aminopterina bloqueia a via “*de novo*” eliminando as células mielômicas, já

que não apresentam a via alternativa. Os linfócitos B que também não se fundiram, ou fundiram-se entre si, sobrevivem ao HAT, mas irão após uma ou duas semanas de cultivo entrar em senescência e morrer naturalmente, restando apenas os híbridos imortalizados (ABBAS et al., 2008, MAZZAROTO, 2009). Essas células são então transferidas para placas de cultivo celular de 96 poços onde serão distribuídas de forma que em cada poço haja apenas uma célula híbrida, e então essa única célula irá originar clones produtores de anticorpos com uma única especificidade. Finalizado o processo de produção dos AcM, prossegue-se com a etapa de caracterização dos mesmos, frente a diversos ensaios imunológicos (MORAES,2008).

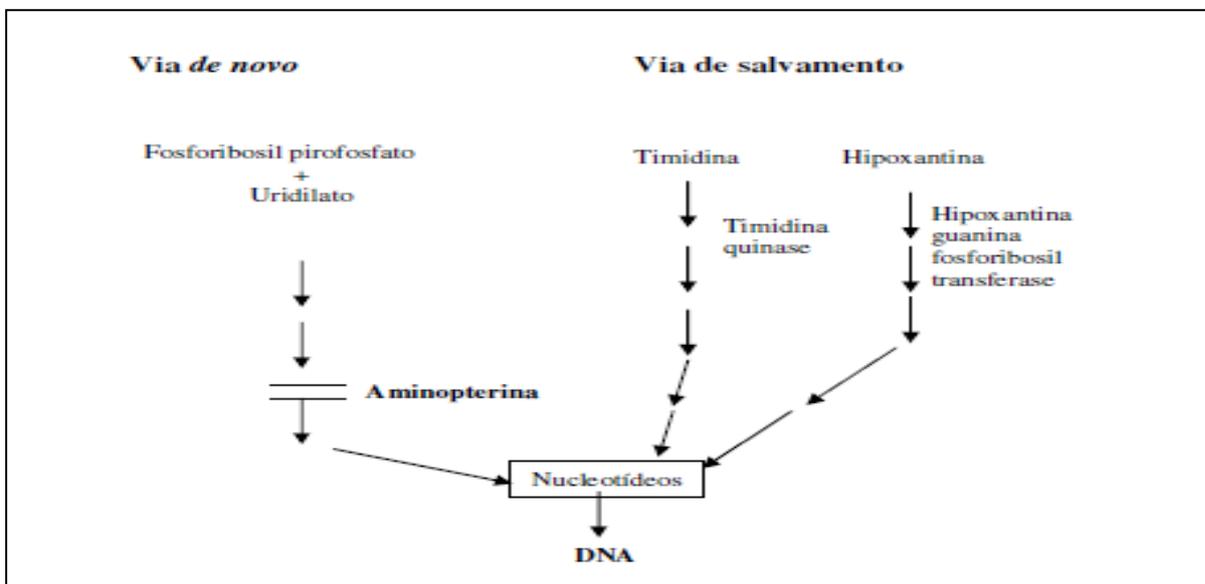


Figura 10. Figura esquemática das vias de biossíntese metabólica dos nucleotídeos, e bloqueio da via “de novo” pela aminopterina (ABBAS et al., 2008).

Desde que a técnica de hibridomas foi desenvolvida, o cultivo de hibridomas para a produção de AcM tem sido uma ferramenta fundamental no desenvolvimento de anticorpos homogêneos para a aplicação na biotecnologia. A metodologia de produção de anticorpos monoclonais é dispendiosa, demanda tempo e é susceptível a influencia de fatores ambientais, contaminação por micro-organismos, fatores relativos à reposta imune humoral e imunogenicidade dos antígenos (MORAES et al.,2007; FERREIRA et al. 2007). No entanto, apresenta ampla utilização no desenvolvimento de produtos com alto valor comercial e aplicações diversas, que vão desde a identificação de agentes infecciosos, identificação e quantificação de hormônios, como também no tratamento do câncer, artrite e outras doenças

autoimunes, desenvolvimento de vacinas e purificação de substâncias de interesse científico e tecnológico (SANTOS et al.,2006; MORAES et al., 2007).

2.9 Anticorpos Monoclonais e Dengue.....

A aplicação da tecnologia dos anticorpos monoclonais (AcM) mostra-se interessante para as mais diversas finalidades. Os AcM são capazes de identificar o vírus e a sua variabilidade antigênica, permitindo o reconhecimento de epítomos específicos, com ótima sensibilidade e especificidade (MAZZAROTTO, 2009). Essa propriedade tem sido aplicada em diversos setores, a exemplo da pesquisa básica, que buscam o entendimento do vírus e relação patógeno hospedeiro; na tentativa no desenvolvimento de vacinas e antivirais específicos para o DENV, assim como para o desenvolvimento de insumos biotecnológicos, em especial na produção de imunodiagnósticos (SANTOS et al.,2006; CHIARELLA et al., 2008; MISTRETTA et al., 2009).

Diversas pesquisas com a utilização de AcM monoclonais , produzidos pela tecnologia de hibridomas, tem revelado informações importantes a respeito do vírus, seu ciclo replicativo, e proteínas até então pouco compreendidas. Em pesquisas como as desenvolvidas por Vazquez et al., 2009 e Noda et al., 2012, foram gerados AcM murinos anti-proteína C, com a capacidade de identificação dessa proteína não somente no citoplasma, região onde tem sido descrito o ciclo de replicação viral, mas também no núcleo e nucléolo de células infectadas, evidenciando a necessidade de estudos adicionais a respeito do ciclo reprodutivo do DENV. Proteínas virais pouco compreendidas têm sido alvos de estudos como o desenvolvido por Xie et al. (2014), no qual informações a respeito da orientação intracelular da NS4B, foram identificadas através da geração de AcM murinos, possibilitando implicações em futuras análises estruturais a respeito do DENV, e possíveis novos alvos terapêuticos.

Em relação à prM, estudo como o realizado por Dejnirattisai et al., (2010), mostrou, através de um painel de 301 AcM humanos, um quadro de resposta diferente daquele esperado em relação a resposta humoral diante do DENV. A resposta anti-prM em infecções secundárias foi dominante em 60% (IC: 67,3-52,2%) dos AcM , enquanto que a resposta para a proteína E, representava 40% do reconhecimento, sugerindo que possivelmente a prM

domine a resposta imunológica ao DENV nesses casos, e não a proteína E. O estudo da prM tem trazido importantes informações a respeito da patogenicidade do vírus, trazendo consigo também, implicações no desenvolvimento de imunobiológicos, uma vez que o conhecimento dessas regiões norteiam epítomos a serem evitados no desenvolvimento de vacinas, ou bloqueados, nos casos do desenvolvimento de terapias antivirais (JULANDER et al., 2011, SAUTTO, 2013).

Outra análise importante relacionada aos AcM no contexto da dengue é a verificação da reatividade cruzada dos mesmos frente aos quatro sorotipos do vírus ou frente a amostras biológicas do hospedeiro. AcM que apresentam reatividade cruzada entre os 4 sorotipos, ou frente a células do hospedeiro têm sido associados principalmente a patogênese viral, podendo sua utilização contribuir no esclarecimento de lacunas existentes na fisiopatologia da Dengue, especialmente na questão do agravamento dos casos. Em Dejnirattisai et al., (2010), foi observado que metade dos AcM anti-NS1 apresentaram limitada reatividade cruzada entre os sorotipos, enquanto que os AcM anti-E e prM apresentaram ampla reatividade cruzada frente aos quatro sorotipos do DENV. Essa reatividade cruzada dos anticorpos frente aos sorotipos heterólogos tem sido apontada como uma das principais causas do fenômeno de ADE, e diversos estudos utilizando AcM, a exemplo de Beltramello et al. ,(2010) e Wahala et al., (2011), trazem a informação de que provavelmente a principal proteína envolvida nesse mecanismo seja a prM. Já em estudos como o realizado por Falconar (1997), AcM dirigidos contra a proteína NS1 foram testados quanto a sua capacidade de reagir frente a elementos do hospedeiro, mostrando que AcM dirigidos a esta proteína podem reagir de maneira cruzada com células endoteliais, fibrinogênio e plaquetas, eventos que estão intimamente ligados aos quadros de hemorragias.

Uma das mais importantes contribuições dos AcM monoclonais no contexto da dengue se dá na busca de anticorpos neutralizantes para o vírus. Anticorpos neutralizantes são aqueles que se ligam nas proteínas do envelope ou capsídeo viral, impedindo a adsorção e penetração do vírion nas células, promovendo assim uma resposta protetora (ABBAS, 2008). Acredita-se que a produção de imunobiológicos seguros e eficazes para o DENV dependa da indução de uma resposta neutralizadora do AcM frente aos quatro sorotipos, promovendo proteção total, uma vez que uma proteção parcial poderia tornar os indivíduos vacinados ainda mais susceptíveis à dengue grave. (AZEVEDO, 2009). Em um estudo realizado por Shrestha et al., 2010, foi gerado um painel de 79 AcM murinos, nos quais 16 reagiram

fortemente com a proteína E dos quatro sorotipos . Através da utilização de análises cristalográficas de raios-X, foi realizado o mapeamento dos epítomos reconhecidos por esses AcM, evidenciando que os mesmos apresentavam-se localizados em regiões do Domínio III (DIII) da proteína E. Em estudo anterior a este, realizado por Rajamanonmani et al., 2009, também utilizando a metodologia da produção de hibridomas murinos, foi produzido um AcM para a região DIII da proteína E do DENV-2, capaz de reagir de forma cruzada com os outros 3 sorotipos da dengue. Além disso, esse AcM mostrou-se neutralizante para os quatro sorotipos virais em ensaios de redução de placa, mostrando-se um candidato para a otimização e humanização de um anticorpo terapêutico no tratamento de infecções graves por dengue.

Em um estudo recente, publicado na *Nature Immunology*, Dejnirattisai et al., 2015, caracterizaram 145 AcM humanos, identificando um epítomo até então desconhecido, na região dos dímero envelope (EDE), que ligam as duas subunidades da proteína E no DENV maduro. Os AcM que reconheceram a EDE mostraram-se amplamente reativos frente aos soros dos pacientes, capazes de neutralizar o vírus tanto em células de inseto como em células humanas. Esses resultados têm implicações para o desenvolvimento de vacinas de subunidade contra o vírus da dengue, induzindo uma resposta protetora direcionada para este sítio.

Outra utilização dos AcM, não menos importante, se dá na sua aplicação no setor dos imunodiagnósticos. Uma vez que ainda não existem vacinas ou antivirais, um diagnóstico rápido e preciso, nas etapas iniciais da infecção, apresenta-se como ferramenta fundamental para o sucesso no tratamento da dengue (WHO, 2012). Nesse contexto, AcM têm sido desenvolvidos na tentativa de melhorar a sensibilidade e especificidade dos mais diversos formatos de kits laboratoriais. Assim, diversos clones produtores de AcM já foram obtidos para os quatro sorotipos virais, com a imunização de animais frente a partículas nativas ou proteínas recombinantes (FALCONAR et al., 1991; ANTÚNEZ et al., 2000, MAZZAROTO, 2009).

Atualmente, os ensaios imunoenzimáticos mais utilizados na detecção do DENV são os ELISAS de captura que detectam IgM, IgG ou NS1, no entanto, estratégias, como a construção de proteínas quiméricas de NS1, contendo regiões conservadas dentro dos quatro sorotipos do DENV, tem sido utilizadas para a produção de AcM com melhor sensibilidade. GOWRI, et al., (2014), em seu estudo, relatou que anticorpos direcionados para NS1 e PrM

em associação aumentaram a sensibilidade do diagnóstico da dengue, sendo capazes inclusive de diferenciá-la de outras infecções por Flavivirus, como o vírus da encefalite japonesa. Outros autores como Vazquez et al., 2009; Noda et al., 2012, vem trazendo a possibilidade de utilização de outras proteínas virais, como a proteína C, na identificação do vírus em diagnóstico.

Apesar da técnica já se encontrar bem padronizada, no Brasil ainda há um déficit em sua produção e aplicação como insumo biotecnológico. Existem no mercado nacional alguns testes para o diagnóstico da dengue, em sua maioria no formato de ELISA. Porém a maioria desses kits são importados de países europeus, EUA ou Austrália, a exemplo do kit Pan Bio Dengue TM (Brisbane, Austrália), o mais importado pelo governo Brasileiro (MAZZAROTO, 2009). A necessidade de importação acaba por onerar os preços do diagnóstico da dengue, o que prejudica especialmente o Sistema Único de Saúde (SUS). No Brasil, Zanluca, et al., (2014) produziram e caracterizaram 22 AcM dirigidos contra isolados brasileiros de DENV-1, DENV -2 e DENV-3, com o objetivo de contribuir para o diagnóstico da Dengue, e gerar possibilidades à indústria biotecnológica nacional. No entanto, apesar de existirem algumas pesquisas na América relacionadas à produção de AcM para o DENV-4, a exemplo de Morens, 1987; Antúnez 2000; até o momento, não houve a produção de AcM para este sorotipo no Brasil, o que torna pesquisas nesse contexto de grande importância, em especial nesse momento de reaparecimento do mesmo após 31 anos sem ser identificado no país.

3.0 - JUSTIFICATIVA

Em um país de dimensões continentais e com uma população especialmente afetada pela dengue, conta-se com o rápido diagnóstico para o tratamento e melhor prognóstico do paciente, possibilitando assim a redução da mortalidade. Pesquisas que envolvam a produção de AcM tem potencial bastante diversificado, especialmente no setor de imunobiológicos e imunodiagnósticos, podendo contribuir para o desenvolvimento da indústria biotecnológica do país. Nesse sentido, a produção de AcM para o DENV é capaz de trazer avanços não apenas ao aspecto comercial, mas também a nível social, pois possibilita opções de um diagnóstico como boa sensibilidade e especificidade, porém com menor custo ao Sistema Único de Saúde.

Tendo em vista a introdução do sorotipo 4, até então a 31 anos sem circular no país, o desenvolvimento de AcM para essas novas cepas circulantes mostra-se de grande interesse, uma vez que podem permitir melhor o desenvolvimento de testes com melhor sensibilidade e especificidade para o vírus atualmente em circulação. Aliado a isso, as contribuições desses anticorpos em pesquisas podem auxiliar a compreensão da interação patógeno-hospedeiro, especialmente no entendimento da evolução para os casos graves, mecanismo ainda não suficientemente compreendidos.

4.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar de anticorpos monoclonais para o DENV-4.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir antígeno viral em cultivo de células C6/36 do *Aedes albopictus*.
- Semi-purificar e concentrar o antígeno viral por ultracentrifugação.
- Produzir anticorpos monoclonais por hiperimunização de camundongos BALB/c.
- Caracterizar os anticorpos monoclonais por ELISA, *Western-Blot*, *Dot-Blot* e Imunofluorescencia indireta.
- Analisar potencial uso no diagnostico de DENV-4.

5.0 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho experimental

A produção e caracterização dos anticorpos monoclonais (AcM) murinos foi realizada de acordo com o esquematizado na Figura 11.

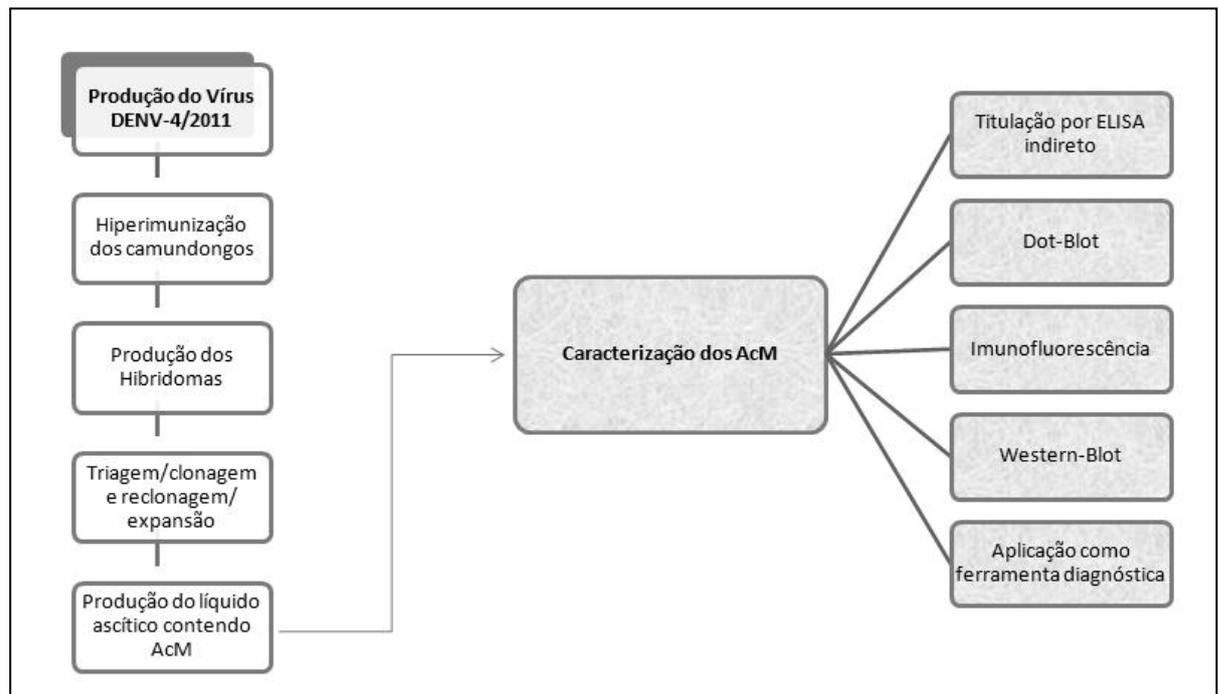


Figura 11. Desenho experimental do processo de produção e caracterização dos AcM.

5.2 Isolado Viral

A cepa viral utilizada para a produção dos AcM (DENV-4/2011) foi isolada em 2011 por Pinho, (2013) e teve sua sequência depositada no Genbank com número de acesso JQ513345. O DENV-4/2104 foi isolado em células C6/36, no Laboratório de Virologia da Universidade Federal da Bahia (LABVIRO) e armazenado a -20°C . O isolamento de ambas as cepas de DENV-4 foi realizada a partir de amostras sorológicas provenientes Hospital Aliança, Salvador-Bahia, sendo que antes de cada isolamento, o diagnóstico sorológico foi

confirmado no LABVIRO através de biologia molecular (RT-PCR, de acordo com a metodologia descrita em LANCIOTTI et al., 1992).

5.3- Culturas de Células

- Linhagem C6/36

As células de linhagem C6/36 provenientes do *Aedes albopictus* foram propagadas em meio Leibovitz's L15 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e solução (100X) de penicilina 5 mg/ml , estreptomicina 5 mg/ml, neomicina 10 mg/mL (Gibco®) ; 10% de caldo triptose fosfato, e incubadas a 28°C em frascos com tampa selada. Como meio de manutenção, foi utilizado o L-15 com redução para 5% de SFB, trocados a cada 48 horas.

- Linhagem SP2/0

As células mielômicas SP2/0 de origem murina foram mantidas em Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Iscove's Modificado) (Gibco®), suplementado com 10% de SFB, 2mM de L-Glutamina; 5 mg/ml de penicilina, 5 mg/ml de estreptomicina, 10 mg/ml neomicina e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Trocas foram realizadas a cada 48 horas.

5.4 Isolamento e produção de antígeno viral

5.4.1 Isolamento viral

Para isolamento do DENV-4/2014, monocamada celulares mantidas em tubos de dimensões 16 x 125 mm foram inoculadas com 25 µL de soro infectado. Durante o processo de inoculação o meio foi substituído para o L-15 (Leibovitz's L15) com apenas 2,5% de SFB (Soro Fetal Bovino), suplementados com penicilina 5 mg/ml , estreptomicina 5 mg/ml, neomicina 10 mg/mL (Gibco®) e 10% de caldo triptose fosfato. A cultura foi então incubada a 28°C e analisada por um período de 15 dias até a visualização do efeito citopático (ECP). As culturas com ECP foram então lisadas pelo processo de congelamento e descongelamento (-20°C) e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 150 µL do sobrenadante foi tomada e utilizada para a segunda inoculação viral. Foram realizadas 3 passagens cegas em tubos, e no final do processo o sobrenadante foi analisado via RT-PCR quanto a presença do vírus.

5.4.2 Produção do Antígeno

Após a propagação das células de linhagem C6/36 e formação completa da monocamada celular, as células foram infectadas com o vírus DENV-4/2011 e incubadas por um período de 10 a 15 dias, intervalo no qual foi verificado ECP. Após esse período, os cultivos foram congelados e descongelados uma vez, e o sobrenadante coletado e centrifugado a 10.000g durante 15 minutos a 10°C. O pellet desse processo, contendo células lisadas e DENV-4, foi coletado e quantificado pela técnica de Lowry, para posterior aplicação nos ensaios de caracterização ELISA, *Dot-Blot*, tendo sido referenciado nesse estudo como extrato proteico de células infectadas (CI). Para os controles negativos, o mesmo procedimento foi realizado em células C6/36 não infectadas, tendo sido referidos como extrato proteico de células não infectadas (CN).

O sobrenadante foi submetido a um processo de precipitação viral com PEG (polietileglicol)-8000 (8%) e NaCl (Cloroeto de Sódio) (2,3%) sob agitação constante “overnight” a 4°C. Na sequência, o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 g por 30 min a 4°C, coletado (para etapas posteriores), e o sedimento ressuspensão em PBS (Solução Salina tamponada com Fosfato), sendo submetido à nova centrifugação a 5.000g por 20 min a 4°C. O sedimento formado foi novamente ressuspensão, dessa vez em NET (Tris HCl 50mM, EDTA 1mM e NaCl 100mM, 10%). O sobrenadante da precipitação inicial com PEG sofreu nova centrifugação, de acordo com o processo descrito, a fim de se recuperar sedimentos que por ventura ainda se encontrassem no meio.

Após ressuspensão em NET, foi realizada uma ultracentrifugação, concentrando uma maior quantidade de partículas virais, que posteriormente tiveram o teor proteico quantificado através do método de Lowry. Finalizado esse processo de concentração, o antígeno foi utilizado para as imunizações dos camundongos BALB/c e caracterização por *Western-blot*.

5.5 Animais de experimentação

Foram necessários 20 camundongos BALB/c com aproximadamente 6 semanas de idade para a produção nos AcM murinos e líquido Ascítico. Adicionalmente, foi necessário uma ratazana (*Rattus norvegicus albinus*) para a coleta de células do timo e estimulação do crescimento dos clones. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Imunologia

da UFBA, após registro e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal da Bahia, protocolo número 044/2013. Os animais foram alimentados com ração comercial, água a vontade e mantidos a temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos os procedimentos e coletas de material biológico foram realizados em consonância com as normas descritas na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA, estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, 2013.

5.6 Produção dos anticorpos monoclonais (AcM)

5.6.1 Hiperimunização em camundongos

Para a indução e estimulação da resposta imune humoral, foram injetados nos animais quatro vezes, por via intraperitoneal, o equivalente a $50\mu\text{g}$ de proteína viral emulsificada em $500\mu\text{L}$ de adjuvante completo de Freund (Sigma[®]) na primeira inoculação, e $25\mu\text{g}$ do antígeno com adjuvante incompleto de Freund nas três inoculações posteriores. O intervalo entre as imunizações foi de uma semana. Após três dias da última inoculação, os animais foram desafiados inoculando o vírus intraperitonealmente sem adjuvante de Freund e 4 dias depois foram então sacrificados por deslocamento cervical. Amostras de sangue, obtidas através da orbita ocular, foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min, e armazenadas a -70°C até a sua utilização. Um camundongo não imunizado foi reservado para coleta de soro negativo frente o DENV-4.

5.6.2 Retirada e processamento do baço pós-imunização

Após sacrifício, os camundongos foram submergidos em álcool iodado para assepsia e remoção cirúrgica do baço. Em sistema estéril, o baço foi retirado, lavado com PBS, cortado em pequenas frações com auxílio de uma lâmina delgada e macerado suavemente através de uma peneira em contato com meio Iscove's Modificado em placa de petri. A suspensão

celular foi então transferida para tubos e submetida à centrifugação de 1500 rpm por 5 min. Feito isso, o sobrenadante foi descartado, e as células esplênicas resuspensas em 10 mL de meio com antibióticos, sem SFB, e então lavadas 2 vezes com centrifugação a 1500 rpm por 5 min. Em seguida, essas células foram resuspensas em 5mL de meio Iscove's e contadas em câmara de Neubauer sob coloração vital do azul de tripan (0,5%). Após contagem, as células esplênicas foram utilizadas no processo de fusão celular na proporção de 5:1 de células SP2/0.

5.6.3 Fusão celular

Após crescimento em garrafas de cultivo de 75 cm², células SP2/0 foram coletadas, centrifugadas a 2000 RPM por 5 min., resuspensas em 10 mL de PBS, e contadas em câmara de NeuBauer. As células esplênicas e as células mielômicas foram então misturadas em proporção de 5:1 em meio Iscove's sem SFB e centrifugadas a 10000 g por 10 min. a 4°C. Seguiu-se com descarte do sobrenadante e a ressuspensão das células em 1mL de uma solução de PEG 400 (Sigma ®)1:2 com PBS, a 37°C, em um tubo submerso em banho térmico a 37°C, tendo o mesmo sido homogeneizado de forma contínua durante 1 min. Em seguida, foram adicionados bem lentamente 20mL de Meio Iscove's Modificado sem SFB e centrifugado a 1.000g por 10 min., a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células resuspensas delicadamente em meio Iscove's Modificado acrescido de antibióticos e 20% de SFB, para então ser distribuída em placas de cultivo de 96 poços, em alíquotas de 100 µL/poço.

Após distribuição nas placas, foram adicionados aos poços 5 x 10⁵ *feeders cells* ou “células alimentadoras” provenientes do timo da ratazana -*Rattus norvegicus*, (coleta similar ao realizado no item 5.5.2). Finalizado esse processo, as placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂, 90% de umidade e após 24 horas foi adicionado 100µL de meio Iscove's Modificado com Glutamina, antibióticos, 20% de SFB e o HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina-Sigma®) a fim de selecionar apenas as células híbridas. A cada 48 horas, foram realizadas trocas de meio contendo HAT até o 12º dia após a fusão. A aminopterina foi retirada gradativamente da cultura, de forma que a partir do 12º dia, foi utilizado o meio acrescido apenas de HT (hipoxantina e timidina) por mais 4 dias até retirada completa. Após a observação de uma confluência celular de 75% nos poços, foi realizado o processo de triagem das células híbridas.

5.6.4 Triagem das células híbridas

Após confluência de 75% nos poços, o sobrenadante das células híbridas secretoras de anticorpos anti-DENV-4 foram triadas através de sua reatividade frente ao vírus em placas de poliestireno sensibilizadas (ELISA). Para tal, 30µg de extrato de células C6/36 infectadas foram adicionados aos poços, diluído em tampão carbonato-bicarbonato (Na_2CO_3 1,7g/L; NaHCO_3 2,86g/L) 0,05M, pH 9,6 e incubadas “overnight” a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-tween (20) 0,05% e bloqueadas com leite desnatado diluído (MOLICO, Nestlé) 5% em PBS por uma hora a 37°C. Em seguida, os sobrenadantes dos clones foram adicionados em cada poço, assim como o soro hiperimune e o soro negativo como controles, e incubados “overnight” a 4°C. Os controles foram utilizados sob a diluição de 1:1000 em PBS-leite (0,05%). Após período de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-tween (20) 0,05% e então o conjugado [IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase produzido em Cabra (Sigma[®])], diluído 1:2500 em PBS-leite 0,05%, foi adicionado, com posterior incubação da placa por 1 hora a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS-tween (20) 0,05% e 1 vez com PBS, para então ser adicionado o revelador. A reação foi revelada com a solução substrato-cromógeno de peróxido de hidrogênio e TMB (3,3,5,5-tetrametilbenzidina, Sigma[®]) respectivamente, por 20 min., interrompida com ácido hidrofúorídrico 0,125% e lida em Espectrofotômetro sob o comprimento de onda de 630nm.

5.6.5 Clonagem e Expansão dos clones Produtores de Anticorpos Monoclonais

Após a identificação das células híbridas produtoras de AcM, seguiu-se com o processo de clonagem, de acordo com o método de diluição limite, para então partir para o processo de expansão em placas e frascos de poliestireno de 75 cm² de cultivo celular. Os clones produtores detectados no ELISA foram resuspensos em Meio Iscove's Modificado acrescido de Antibióticos, 20% de SFB e L-Glutamina, e diluídos em série sob a razão de 2 até que houvesse apenas 1 célula do clone/poço. Associado a esse processo, foram distribuídas nos poços as células do timo de ratazana. As placas foram então incubadas a 37°C e 5% CO₂, com troca de meio a cada 48 horas, e acompanhamento do desenvolvimento clonal até a tomada de pelo menos 90% dos poços.

A partir desse momento foi iniciado o processo de expansão clonal, no qual foram selecionados os poços de maior diluição das células cujos clones tivessem se desenvolvido. Foi realizado um novo ELISA para a análise da produção de anticorpos, e então selecionados para expansão, os clones produtores cujo sobrenadante apresentaram maior concentração de AcM em leitura colorimétrica (maiores D.O.) . As células foram ressuspensas em Meio Iscove's Modificado com Antibióticos, 20% de SFB, L-Glutamina, e transferidas para placas de 24 poços, com troca do meio contendo 10% de SFB, a cada 48 horas. O mesmo processo foi repetido transferindo-se as células para placas de 6 poços, e finalmente para os frascos de 75cm², com posteriores repiques em um segundo frasco de 75cm², garantindo uma quantidade de $2,5 \times 10^6$ células que posteriormente foram inoculadas nos camundongos para a produção de líquido ascítico.

5.6.6 Obtenção de líquido ascítico

Foi injetado 0,5 mL de Pristane (2,6,10,14-tetrametil-pentadecano) (SIGMA[®]) intraperitonealmente nos camundongos BALB/c estimulando uma resposta inflamatória. Após sete dias, foi injetado nos camundongos, intraperitonealmente, uma suspensão de $2,5 \times 10^6$ células de hibridoma. Após seis dias, o líquido ascítico foi obtido por punção abdominal. Após coleta, o líquido ascítico foi centrifugado a 10.000 RPM por 5 minutos, coletado o sobrenadante e armazenado a -20°C para a realização dos ensaios de caracterização.

5.7 - Ensaios para a caracterização dos anticorpos monoclonais (AcM).

5.7.1 ELISA Indireto

O ELISA Indireto utilizado para a titulação dos anticorpos em líquido ascítico foi realizado de maneira muito similar ao realizado na triagem (item 5.6.4). Os poços da placa de poliestireno foram sensibilizados com 30µg do extrato proteico de células C6/36 infectadas diluídas em tampão carbonato-bicarbonato. Após incubação “overnight”, as placas foram lavadas e bloqueadas com leite desnatado. Foram realizadas então diluições seriadas do líquido ascítico, em PBS-leite 0,5%, em intervalos que variaram 1:4 a 1:516, na razão de diluição 2 . Foram utilizados como controles positivo e negativo, soro hiperimune e o soro negativo respectivamente, sob a diluição de 1:1000 em PBS-leite (0,05%), em duplicata. As

placas foram incubadas “overnight” a 4°C, e no dia seguinte, lavadas 3 vezes com PBS-tween e incubadas com o conjugado (1:2500 em PBS-leite 0,05%) por 1 hora a 37°C. Após esse período, procederam-se mais 3 lavagens e revelação como o descrito no item 5.6.4. Os resultados obtidos foram então plotados no Software Excel, e analisados através da confecção de gráfico para as curvas de titulação.

5.7.2 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Células C6/36 infectadas foram coletadas, contadas em câmara de Neubauer, e então misturadas na proporção de 1:4 para células não infectadas. Como controle negativo, foram testadas a reatividade dos AcM frente a células C6/36 não infectadas. Em sequência as células foram adicionadas aos poços das lâminas de imunofluorescência, fixadas com acetona a -20°C por 10 min, e então incubadas com os AcM “overnight” em câmara úmida a 4°C. Após esse período, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS (10 min cada lavagem) para então serem incubadas com IgG anti camundongo marcada com fluoresceína (FITC) em diluição de 1:40. Após incubação, as lâminas foram novamente lavadas (3 vezes em PBS), contra-coradas com azul de Evans, e montadas para visualização. Para a montagem, em cada poço foi adicionado uma alíquota de 10 µL de Glicerina (diluída em 1:2 com PBS), seguido da adição de uma lamínula, para então verificação no microscópio de fluorescência. A reação foi positiva para a observação de uma coloração verde fluorescente no citoplasma celular.

5.7.3 Detecção do antígeno viral: *DOT-BLOT*

Foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences), através de um multifiltro *Dot-blot*, 100 µL de suspensões contendo 30, 15, 10 e 5 µg do extrato de células C6/36 infectadas com DENV-4 (CI) e extrato de células não infectadas (CN) para controle negativo. As membranas foram cortadas (em formato de tiras) e bloqueadas com PBS-leite 5%, para evitar sítios livres de reação, por 1h a temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, as tiras foram imersas individualmente nos líquidos ascíticos, diluídos 1:5 em PBS-leite 0,5%, contidos em pequenos “pacotes” plásticos,

que após a adição das tiras foram selados de maneira a evitar perda da solução. Esse sistema foi então incubado “overnight” a temperatura ambiente, e após o período, cada membrana foi lavada com PBS-tween (PBS-Tween (20) 0,05%) , 3 lavagens por 10 minutos sob leve agitação, e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído em 1:2500 com PBS leite (0,05%) , por 1 hora. Finalizando o período de incubação, foram realizadas lavagens com PBS-tween (2 lavagens por 10 minutos) e 1 apenas com PBS, 10 min., seguindo-se da revelação com 3’3’ Diaminobenzidina (DAB) (10mg/10ml PBS) na presença de peróxido de hidrogênio (10µl). A reação foi interrompida com sucessivas lavagens em água destilada

5.7.3- Processo de coloração do *SDS-PAGE* para análise do perfil de fracionamento proteico

Inicialmente, 60 µg de proteínas do DENV-4 semi-purificado foram desnaturadas com reagente de Laemmli (LAEMMILI, 1970), (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0.2% azul de bromofenol) e fervura em banho maria durante 3 minutos. Após desnaturação, as proteínas foram então fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, em gradiente de 5-15%, e fixadas no gel com uma solução de metanol/ ácido acético/ água nas proporções de 50:10:40 respectivamente, por 1 h, e leve agitação. Em seguida, o gel foi imerso em uma solução de metanol: ác. acético e água nas proporções descritas, adicionado de 0,2 % de azul de *coomassie*, por “overnight” a -4°C. Por fim, seguiu-se com o processo de descoloração do gel com uma solução de metanol/ ácido acético/ água nas proporções 10:5:85 , de forma que as proteínas permanecerão na coloração azul enquanto que a poliacrilamida voltará a coloração translúcida.

Os pesos moleculares das bandas visualizadas após a coloração foram calculados usando-se o RF (Distância em centímetros de migração da proteína no gel / distância da migração do azul de bromofenol presente no tampão de corrida das amostras), e comparadas com o padrão de migração das proteínas do marcador molecular proteico (Sigma-Aldrich ®, S8445).

5.7.4- Processo de coloração do *SDS-PAGE* para a análise de Glicoproteínas

A metodologia utilizada para a identificação de glicoproteínas na eletroforese do DENV-4 em poliacrilamida é descrita em GANDER, 1984. Após eletroforese e fracionamento proteico, o gel foi incubado por uma 1 hora em uma solução de isopropanol/ ácido acético/ água nas proporções de 25:10:65 respectivamente, no intuito de fixar as proteínas. O gel então foi imerso em outra solução com as mesmas proporções descritas de isopropanol/ ácido acético/ água, acrescida de 0,2% de azul de bromotimol por 2 horas. Na sequência, foi realizada uma segunda incubação do gel em uma solução contendo Ácido Sulfúrico e Etanol Absoluto na proporção (80:20) em temperatura ambiente, com agitação constante, até a verificação de uma opalescência no gel. As bandas com glicoproteínas inicialmente mostram-se vermelhas, mantendo-se nessa coloração por até 1 hora. Prossegue com descoloração do gel com água, e a apresentação das bandas correspondentes às glicoproteínas em amarelo.

5.7.5 Eletrotransferência das Proteínas Virais: *WESTERN - BLOT*

Suspensões contendo 60 µg de proteínas do vírus concentrado foram inicialmente desnaturadas com a adição de reagente de Laemmli e fervura em banho maria durante 3 minutos. As proteínas virais foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% e então transferidas para membranas de nitrocelulose por eletrotransferência durante 1h a 100 mA. Para a verificação do sucesso da eletrotransferência das proteínas virais, as membranas foram submetidas à coloração com vermelho de *Ponceau* 10%, e uma vez constatada a presença das bandas proteicas, foram cortadas as tiras correspondentes ao perfil eletroforético de cada poço preenchido para fracionamento. Em seguida, as tiras foram descoradas em PBS e bloqueadas com 5% de leite desnatado liofilizado (MOLICO, Nestlé) diluído em PBS, sob agitação constante, e temperatura ambiente por 1 hora. Feito isso, as tiras foram individualmente imersas no líquido ascítico em diluição 1: 5 em PBS-leite 0,5%, em sistema idêntico ao descrito no item 5.6.3, e incubadas “overnight” a temperatura ambiente.

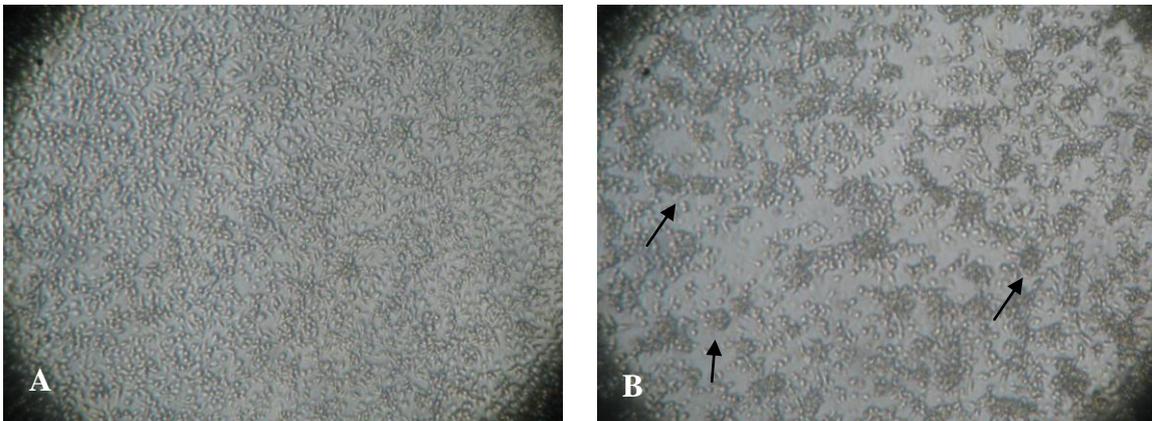
Após período de incubação, seguiu-se com as lavagens das membranas em PBS-Tween (3 lavagens a cada 10 min. cada) e incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de

camundongo conjugado com peroxidase (1:2500) durante 1 h e 37°C. Após esse período, as tiras foram mais uma vez lavadas em PBS-Tween (2 lavagens por 10 minutos) e PBS (1 lavagem por 10 min.) e por fim reveladas com uma solução de 3'3' Diaminobenzidina (DAB) (10mg/10ml PBS) na presença de peróxido de hidrogênio (10µl). A reação foi interrompida com sucessivas lavagens em água destilada.

6.0- RESULTADOS

6.1 *Produção do antígeno viral e desenvolvimento da fusão*

Após a propagação das células C6/36 e infecção viral, o efeito citopático foi verificado no 15º dia de incubação, e a presença do DENV-4/2011 confirmada pelo RT-PCR. O efeito citopático observado está demonstrado na Figura 12, no qual houve um padrão de descolamento de células e deformação da monocamada, assim como a formação de sincícios e uma leve alteração na morfologia de algumas células arredondadas para fusiformes.

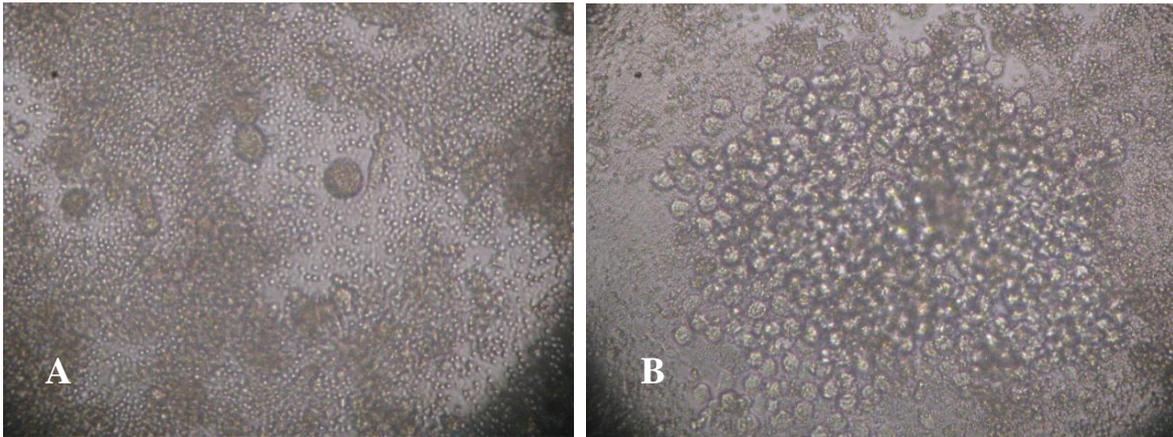


Fonte: Autora, 2014

Figura 12. Efeito citopático em células C6/36 infectadas com o DENV-4. Microscopia ótica sob o aumento de 100x. A – Monocamada de células C636 sem a infecção. B – Efeito citopático após 10 dias de infecção com o DENV-4. Nota-se formação de sincícios, a exemplo dos indicados pelas setas, efeito citopático característico do DENV na infecção de células C6/36, além de um padrão de descolamento da monocamada celular.

Dado seguimento do processo de concentração viral com o PEG, as concentrações de proteínas obtidas, segundo análise pelo método de Lowry, variaram de 1,3mg/mL a 2,3 mg/mL. Para o processo de fusão, as células de mieloma foram misturadas com esplenócitos de camundongos imunizados contra o DENV-4 e distribuídas nas placas de 96 poços, obtendo-se resultado bastante satisfatório, pois quase todos os poços continham pelo menos um clone após 15 dias da sua formação (Figura 13). Através da triagem com ELISA, pôde ser

observada a presença de 110/240 poços com produção de anticorpos que atingiam densidade ótica (D.O) acima de 0,155 o que corresponde a 45,83% desse total, e desses, 39/110 (35,45 %) apresentaram D.O acima de 0,200. Dentre as culturas de células híbridas, foram selecionados 10 com os sobrenadantes de maiores densidades óticas para a realização do processo de expansão clonal e produção do líquido ascítico, tendo os mesmos sido denominados A2, B1, B4, C11, D2, E4, F10, F12, H1, H12.



Fonte: Autora, 2014

Figura 13. Desenvolvimento dos hibridomas. **A-** Mistura de células de SP2/0, esplenócitos e células de timo no 1º dia da fusão. **B-** Hibridomas após 15 dias de incubação. Células sob cultivo em placas de 96 poços observadas em microscopia ótica sob o aumento de 400x.

6.2 Caracterização dos AcM anti-DENV-4.

6.2.1 Titulação dos AcM

Através do ELISA foi realizada a titulação dos 10 anticorpos monoclonais em líquido ascítico frente á placas sensibilizadas com o vírus. A partir da relação D.O *versus* diluição foi possível a confecção de curvas padrão para comparação das titulações do AcM nos líquidos ascíticos (Figura 14).

Através do gráfico, foi analisado o ponto de inflexão como referência para as titulações ótimas de uso dos AcM. Observa-se que um ponto de inflexão para a maioria dos AcM (E4,

H12, H1,A2, B4, B1) seria de 1/64, com exceção para os AcM C11, F12, D2 que por apresentarem pontos de inflexão muito próximos ao controle negativo, apresentam sua titulação ótima nas diluições de 1/16.

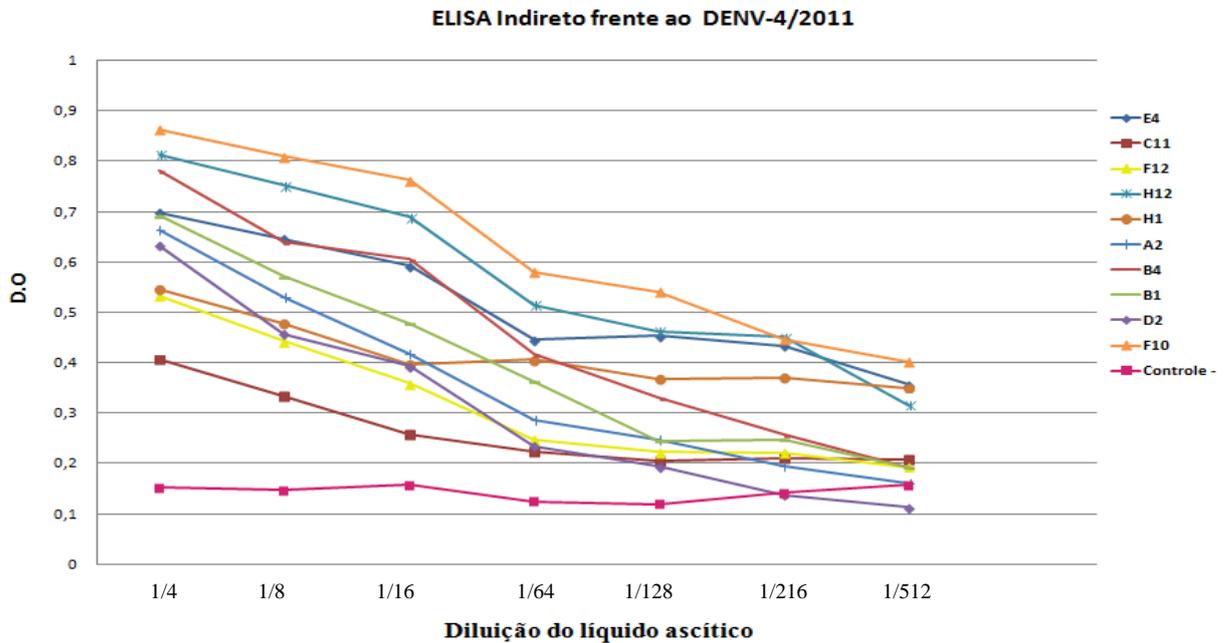


Figura 14. Titulação dos AcM frente ao ensaio no modelo ELISA Indireto. As curvas padrão foram obtidas através da relação Densidade Óptica (D.O) e diluição do líquido ascítico. A diluição de 1/64 mostra-se como o ponto de inflexão comum aos AcM E4,H12,H1,A2,B4;B1, e 1/16 para o C11, F12, D2.

6.2.2 Dot-Blot: Detecção de antígeno viral

Através da técnica do *Dot-Blot* foi possível selecionar dentre os 10 AcM testados, aqueles que apresentam uma maior reatividade para proteínas virais no extrato de células C6/36 infectadas (CI). Foram testadas as concentrações de 30, 15, 10 e 5 µg de extrato CI, e extrato de células C6/36 não infectadas (CN) como controle negativo. Foi possível verificar, de acordo o evidenciado na Figura 15, que todos os AcM testados (A2, B1, B4, C11, D2, E4, F10, F12, H1, H12) foram capazes de detectar proteínas no extrato CI, no entanto, em altas concentrações (30 e 15 µg) houve a verificação de um reconhecimento inespecífico dos AcM frente ao extrato CN. Nesse sentido, foram determinadas as concentrações de proteínas a qual houvesse a maior reatividade dos AcM, mas com menor reconhecimento do padrão celular.

Baseado nesses critérios, os AcM F10, D2, H12, H1, B4, B1 apresentaram detecção ótima em 10µg dos extratos celulares, enquanto que o AcM E4 apresentou concentração ótima de 5µg do extrato. Por fim, foi observado que os AcM A2, C11 e F12 não mostraram capacidade de distinção entre proteínas de células infectadas ou não infectadas.

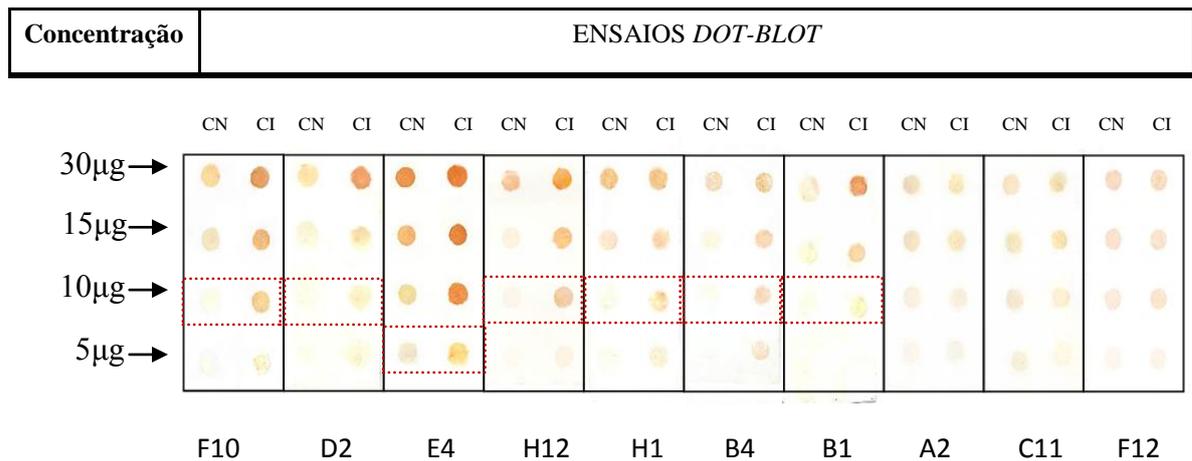


Figura 15. Ensaio *Dot-Blot* realizado para 10 AcM. Tiras de nitrocelulose sensibilizadas com diluições seriadas de extratos proteicos de células infectadas (CI) com o DENV-4/2011 nas concentrações indicadas, e extratos proteicos de células não infectadas (CN) como controle. Estão ressaltadas nos quadros as concentrações ótimas do extrato proteico para a detecção dos monoclonais por essa metodologia.

6.2.3 Imunofluorescência Indireta (IFI) em Células C636.

Foi realizada a IFI para a demonstração da capacidade dos AcM reconhecerem proteínas virais em culturas celulares. A reatividade dos AcM anti-DENV-4 analisadas através de ensaios de IFI mostrou que os AcM F10, B1, B4, H1, E4, H12 foram claramente positivos na reação imunofluorescência, como o demonstrado na Figura 16. No entanto, os AcM D2, A2, C11 e F12 mostraram fraca reatividade frente às células infectadas. É possível observar que os AcM F10, B1, B4, H1, E4 reconheceram inclusões citoplasmáticas bem distribuídas no citoplasma celular, enquanto o AcM H12 apresentou reconhecimento proteico mais distribuído nas regiões próximas a membrana celular. Não houve reconhecimento do controle (-).

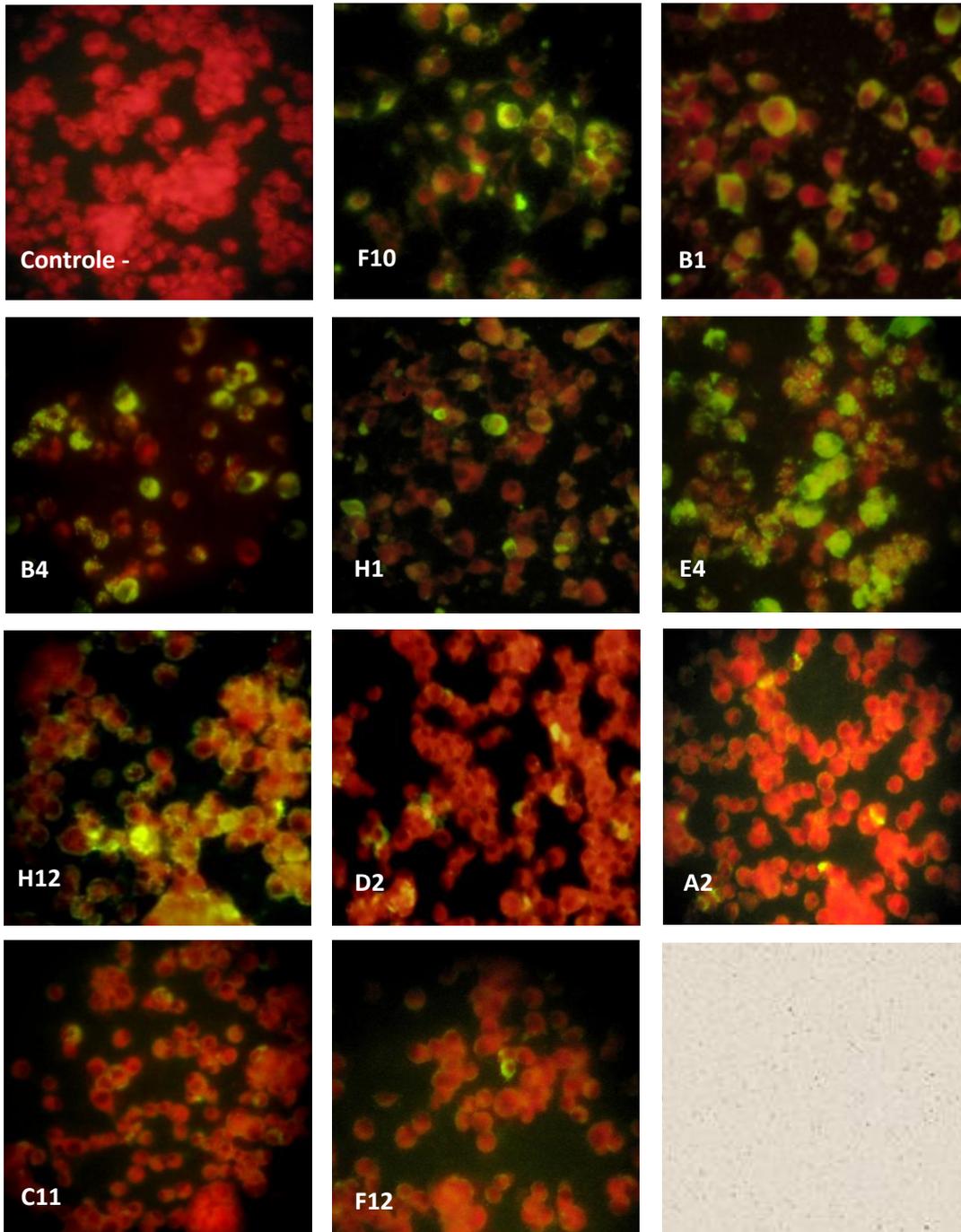


Figura 16. Ensaio de imunofluorescência Indireta utilizando células C6/36. Reatividade dos 10 AcM produzidos frente a células infectadas com o DENV-4 (misturadas na proporção 1:4 para células não infectadas). Como controle negativo, células não infectadas. Foram utilizados como anticorpos secundários o anti-IgG de camundongo conjugados com FITC. Em seguida as lâminas foram contra-coradas com azul de Evans (0,1%) por 3 min e montadas com glicerina/PBS e lamínulas, para observação em microscopia de fluorescência. Visualização em aumento de 100X.

6.2.4 Western-Blot

A reatividade dos AcM com proteínas virais foi determinada através de *Western-blot*. Como etapa inicial do processo de identificação do alvo proteico dos AcM, foi realizado o *SDS-PAGE* para fracionamento das proteínas do vírus concentrado. Foi possível a visualização de 6 bandas proteicas, no qual 5 delas foram correlacionadas aos pesos moleculares das proteínas virais, de acordo com o descrito na literatura. Acredita-se que as bandas localizadas no intervalo entre 24 e 36 kDa tratem-se de precursores prM, dentre as quais, a de 24 kDa trataria-se da prM enquanto a de 36 kDa seria a C/prM. Outras bandas, na altura de 55, 66 e 97 kDa foram relacionadas a NS1, E e E/E dímero respectivamente (Figura 17. A). Após essa análise, foi realizado outro *SDS-PAGE* , em gel de 15%, no intuito de determinar quais das bandas eram compostas por proteínas com glicosilações em sua estrutura, podendo ser bem visualizadas as 5 bandas mencionadas em coloração amarela no gel de Poliacrilamida (Figura 17.B).

No segundo momento, as proteínas do vírus concentrado foram fracionadas em gel de poliacrilamida e transferidas às membranas de nitrocelulose, seguida da incubação com os AcM e revelação com 3,3-diaminobenzidina. Como pode ser verificado na Figura 18, 8 dos 10 AcM (E4, B1, F10, B4, D2, H1, C11, H12) foram capazes de reconhecer epítomos de proteínas virais em condições desnaturantes. No entanto, não foi identificado reconhecimento, nesse ensaio, para os AcM A2 e F12, podendo os mesmos tratarem-se de anticorpos reativos para epítomos conformacionais.

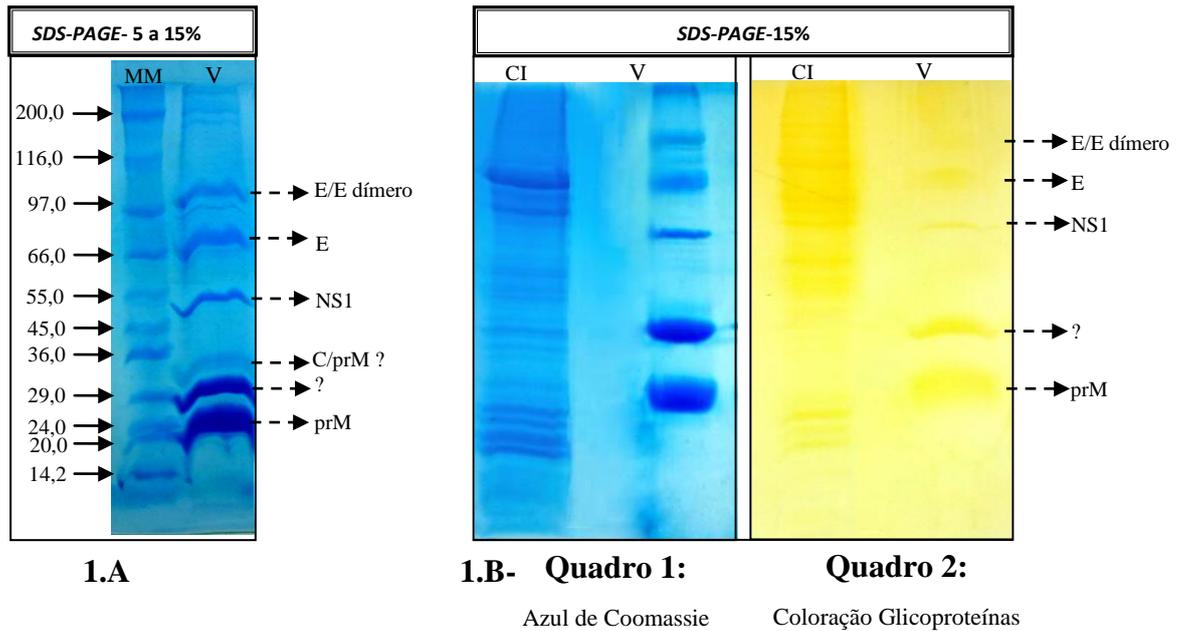


Figura 17. SDS-PAGE. 17.A -Perfil de fracionamento do vírus DENV-4/2011 concentrado (V) em gel de gradiente 5-15%. MM- Marcador molecular Sigma-Aldrich S8445. As setas indicam as prováveis proteínas virais, de acordo com os pesos moleculares. 17.B- Perfil de fracionamento do vírus DENV-4/2011 em gel de 15%, e perfil de fracionamento do extrato proteico de células infectadas (CI). Quadro 1: Coloração azul de Coomassie. Quadro 2: Coloração para glicoproteínas com azul de bromotimol, no qual em meio ácido, as bandas correspondentes a proteínas glicosiladas encontram-se em amarelo.

Ainda em relação ao *western-blot*, foi possível observar que os AcM E4, B1, F10, B4, D2 ,H1, C11 reconheceram uma fração proteica localizada em aproximadamente 24 kD. Tal peso molecular é compatível com a proteína prM, uma glicoproteína que varia de 19 a 26 kD. Além disso, foi possível verificar que os AcM E4, B1 e B4 apresentaram reconhecimento cruzado com outras proteínas associadas ao vírus, como E, NS1 e C/prM. Além dessas, foi possível detectar uma fraca banda de reconhecimento inespecífico no extrato de células não infectadas, na altura de 105 kD. Esses resultados, assim como os resultados anteriormente apresentados foram sintetizados na Tabela 1.

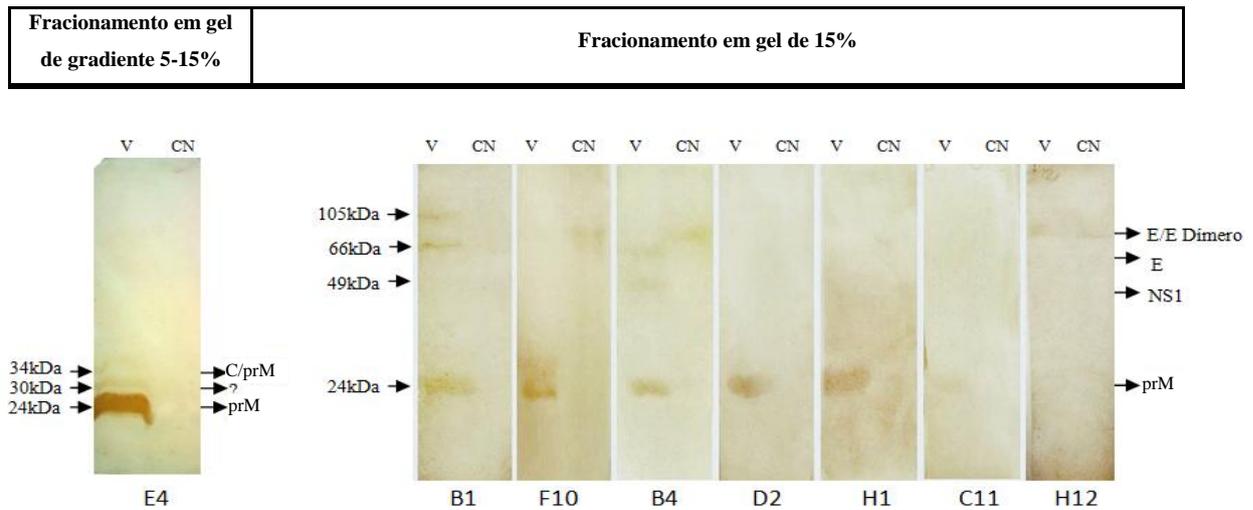


Figura 18. *WESTERN-BLOT*. Membranas de nitrocelulose com diferentes frações proteicas, reconhecidas pelos AcM produzidos. CN (extrato de células não infectadas) , (V) Vírus concentrado. O *SDS-PAGE* do AcM E4 apresenta padrão de eletroforese realizado em gel de gradiente 5-15%, situação no qual foi melhor evidenciado o reconhecimento da banda de 34 kDa nas tiras de nitrocelulose. O *SDS-PAGE* dos outros AcM foi realizado em gel de 15%. As membranas foram reveladas 3,3 Diaminobenzidina, após incubação “overnight” com os diversos AcM.

Tabela 1. Síntese dos resultados obtidos para os diferentes testes de caracterização dos AcM produzidos contra o DENV-4.

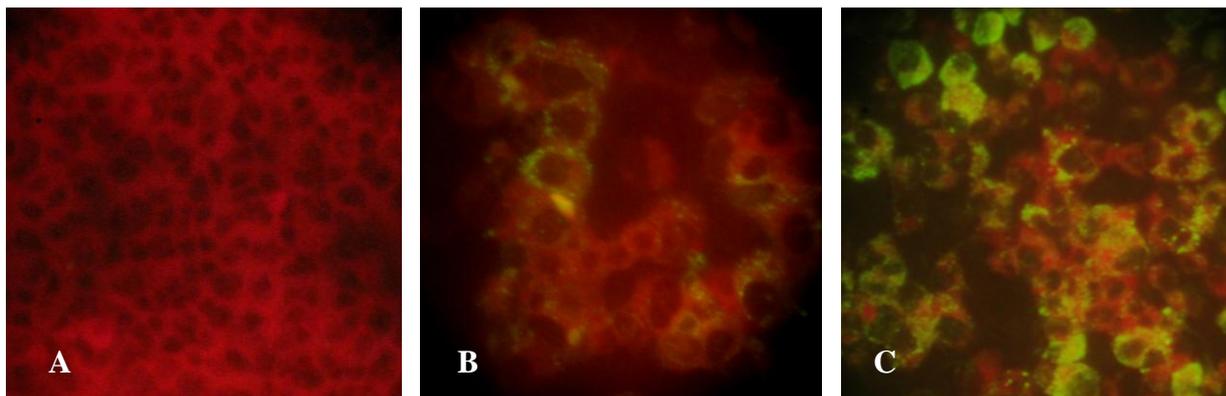
AcM	Título ^a		Dot-Blot	IFI	Western-Blot	
	Líq. Ascítico	Concentração ótima de CI	Intensidade ^b	Reação	Reconhecimento proteico	
A2	1:64	-	+	Não	-	
B1	1:64	10µg	++	Sim	E/E dímero; E; prM	
B4	1:64	10µg	++	Sim	NS1; E; prM	
C11	1:16	-	+	Sim	prM	
D2	1:16	10µg	+	Sim	prM	
E4	1:64	5µg	+++	Sim	prM; ?; C/prM	
F10	1:64	10µg	+++	Sim	prM	
F12	1:16	-	+	Não	-	
H1	1:64	10µg	++	Sim	prM	
H12	1:64	10µg	++	Sim	E/E dímero	

^aTitulação obtida por Elisa Indireto

^b Intensidade : + fracamente positivo; ++ reativo; +++ fortemente reativo.

6.3- Aplicação dos AcM. Identificação do DENV-4/2014 em cultivo celular.

Baseado nos testes realizados escolheu-se o AcM monoclonal E4 para verificar sua aplicabilidade frente à identificação de uma novo isolamento de DENV-4. Para isso, foi realizado o isolamento de uma nova cepa viral, proveniente do soro de paciente (o DENV4/2014), em células C6/36. Após observação do efeito citopático e coleta das células foi possível verificar ,através de ensaios de IFI, o reconhecimento de proteínas virais do DENV-4/2014 pelo AcM E4 em células C6/36, sem reconhecimento do padrão, como o demonstrado nas Figura 19. É possível observar também, indicados pelas setas, a presença da imunofluorescência bem delimitada na região citoplasmática, região onde ocorre o ciclo de replicação viral.



Fonte: Autora,2014

Figura 19. Aplicação dos AcM. Ensaio de IFI utilizando células C6/36. Aumento de 400X. A controle (-) do AcM E4 em células C6/36. B- Controle positivo utilizando AcM E4 para a detecção do DENV4/2011. C- Detecção do novo isolamento viral (DENV-4/2014) proveniente do soro de paciente. Indicados pelas setas a identificação de proteínas virais em inclusões citoplasmáticas. As células foram incubadas com o AcM E4 por 24 horas, e como anticorpos secundários, foi utilizado o anti-IgG de camundongo conjugado com FITC.

7.0- DISCUSSÃO

O desenvolvimento da tecnologia da produção de AcM, através da preparação de hibridomas, constituiu um marco na imunquímica. Sua primeira aplicação se deu na substituição dos anticorpos policlonais nos mais diversos ensaios imunológicos, tais como ELISA, IFI, Imunohistoquímica e Imunoblot, conferindo-lhes maior sensibilidade e especificidade (MARQUES,2005; FONTES,2003). No entanto, uma das mais importantes e fundamentais contribuições dos AcM foi ajudar a compreender diversos processos imunes, e possibilitar a manipulação *in vitro* dos anticorpos. Desde então, um grande espectro de possibilidades foi gerado em torno da aplicabilidade dos AcM, incluindo tratamento de doenças e desenvolvimento de vacinas (MARQUES,2005).

As possibilidades de aplicações de AcM no contexto da dengue mostram-se de grande interesse, uma vez em que não há vacinas ou antivirais específicos, e conta-se com o rápido diagnóstico como uma das principais medidas na redução da mortalidade (WHO, 2012). Há também muitas lacunas no que diz respeito à compreensão da relação patógeno-hospedeiro, em especial no desenvolvimento dos casos graves da doença, podendo os AcM contribuir também no preenchimento dessas lacunas (ANTÚNEZ et al. ,2000). Nesse estudo, foi utilizado como antígeno para a produção de AcM murinos, partículas virais completas do DENV-4, podendo portanto gerar clones produtores de anticorpos dirigidos às mais diversas proteínas do vírus, em especial à aquelas mais imunoreativas (E, prM e NS1) (SAUTTO et al., 2013).

Através do ELISA indireto foi possível observar o reconhecimento do DENV-4, em diferentes titulações dos AcM, além da determinação das diluições ótimas dos líquidos ascíticos, evidenciando a possibilidade de aplicação dos AcM como insumo biotecnológico nesse tipo de ensaio. Apesar de se tratarem de dados preliminares, mostra-se um potencial de utilização desses anticorpos no diagnóstico do DENV-4. Dando suporte a esses resultados, houve uma concordância das reatividades observadas entre o ELISA e *Dot-Blot* (ver tabela 1), sendo verificado uma boa sensibilidade para a detecção por parte dos AcM produzidos pelos hibridomas F10, D2, E4, H12, H1,B1 ,B4 enquanto os AcM A2,C11,F12 apresentaram baixa sensibilidade e especificidade para a detecção de antígenos virais.

Nos ensaios de *Dot-Blot* foi possível a detecção dos AcM frente ao DENV-4 no extrato de células infectadas (10 µg) , mostrando uma possível utilização desse método no diagnóstico da dengue. A capacidade de reconhecimento viral em ensaios como *Dot-Blot* geram a possibilidade da utilização desses anticorpos no desenvolvimento de testes imunocromatográficos, como por exemplo, pois ambas são metodologias similares. Assim como o *Dot-Blot*, os testes imunocromatográficos se baseiam na utilização de tiras de um material de suporte, como as membranas de nitrocelulose, impregnadas com reagentes secos que serão ativadas ao contato com amostras fluidas (REID, 2001; ANTHONY,2009). Estudos como o realizado por MACHADO et al., 2013 vem adaptando essa metodologia na detecção de proteínas não estruturais do DENV, gerando assim uma alternativa promissora nos ensaios de diagnóstico da Dengue, com o uso de biotecnologia nacional.

Foi observado no *Dot-Blot* uma reatividade cruzada frente ao extrato de C6/36 (CN), dado de interesse, uma vez que a mesma possa estar relacionada com a patogenicidade do vírus. Estudos realizados por Sautto et al., (2013), Huang et al., (2006) sugerem que a presença epítomos repetidos entre vírus e células hospedeiras podem estar relacionados a um aumento da infecção. Esse tipo de resposta pode inclusive estar relacionada a uma reação autoimune, quadro características da doença (FALCONAR et al., 1997, AVIRUTNAN et al., 2006, LEI et al., 2001). Até o momento essa resposta autoimune tem sido descrita especialmente para a proteína NS1, no qual acredita-se que esse mimetismo molecular com proteínas endógenas do hospedeiro estejam associada ao comprometimento da integridade das células do endotélio e depleção de plaquetas (FALCONAR et al., 1997; LEI, 2001). Nesse sentido, os AcM produzidos em nosso estudo mostram-se como uma ferramenta interessante em estudos futuros para a verificação de reatividade cruzada frente outras amostras biológicas, podendo assim gerar informações relevantes a respeito da patogenicidade do DENV.

A análise da reatividade dos AcM através dos ensaios de IFI mostrou a capacidade de identificação de proteínas virais, uma vez que todos os monoclonais testados responderam positivamente à presença do DENV-4, mesmo com diferentes reatividades. Essa capacidade de reconhecimento sugere a possibilidade de utilização dos mesmos na confirmação do DENV-4 em isolamento viral, ou como ferramenta em estudos de base frente a esse sorotipo, e epítomos virais reconhecidos.

No perfil de eletroforese em *SDS-PAGE* foram identificadas 5 prováveis proteínas do DENV-4, a prM, NS1, E e E/E dímero. Além dessas, há a presença de uma fraca banda proteica na altura 34 kDa, ainda a ser discutida posteriormente, no qual acreditamos ser referente à proteína C/prM. A presença de precursores prM tem sido relatada desde 1990, em estudos como o realizado por Randolph et al., e o primeiro relato de isolamento do precursor C/prM ocorreu em 1993, por Murray et al., estando a mesma intimamente relacionada à lise de células C6/36 infectadas. A presença de várias proteínas em seu estágio precursor pode ser justificada principalmente pela metodologia utilizada na produção do vírus, na qual, ao se realizar o congelamento e descongelamento da monocamada, promove-se a lise celular, com liberação de grande quantidade de vírus, em diversos estágios de maturação, para o meio de cultivo.

Através do fracionamento proteico do vírus concentrado no *SDS-PAGE*, e coloração por azul de coomassie, obteve-se uma provável identificação das proteínas virais baseadas na correlação com peso molecular. A análise da coloração indicadora das glicoproteínas em gel adicionou, a esse perfil, informações a respeito da constituição química das proteínas (a presença de componentes glicoproteicos), favorecendo assim uma melhor identificação das bandas visualizadas. Uma vez que a prM, NS1, E e E/E dímero apresentam glicosilações em suas estruturas (LINDENBACH, 2001 e 2003), a coloração amarela encontrada para as mesmas são compatíveis com sua estrutura química e correlação com peso molecular.

Seguindo o processo de caracterização, foi realizado o *Western-Blot* para a identificação das frações proteicas reconhecidas pelos AcM. Foi verificado que 8 dos 10 AcM reconheceram proteínas de peso molecular compatível com a prM, 1 reconheceu uma banda compatível com E/E dímero, e outros 2 não foram identificados, portanto a maioria dos AcM testados reconhecem epítomos lineares. Alguns estudos relacionados a avaliação de anticorpos humanos gerados durante a infecção natural DENV tem trazido a informação de que a maioria destes anticorpos apresentam especificidade para a prM, e que pacientes com infecções secundárias de dengue apresentam taxas ainda mais altas de anti-prM quando comparadas as infecções primárias. (DEJNIRATTISAI et al., 2010; ALWIS et al., 2011; JULANDER 2011, WAHALA, 2011). Nossos resultados apresentam-se compatíveis também com os relatados em Wahala (2011), e Beltramello (2010), cuja produção de um painel de AcM frente ao vírus revelou a presença de um maior reconhecimento para a prM. É possível também que essa resposta direcionada especialmente para prM seja resultado de uma grande concentração de

vírus em seu estado imaturo, decorrente da metodologia utilizada, e como pode se visualizado na figura 17.A, há uma forte banda relacionada a prM e seus precursores, evidenciando uma maior concentração dessa proteína na solução viral semi-purificada.

Pesquisas realizadas por Dejnirattisai et al., (2010) sugerem que os anticorpos anti-prM se ligam nas proteínas prM não clivadas presente na superfície viral apresentando pouca ou nenhuma capacidade de neutralização, mesmo em altos títulos. Em preparações de microscopia crio eletrônica têm sido demonstrado uma clivagem incompleta da prM no vírus maduro, sugerindo uma possível distribuição de prM e proteína M na superfície viral. Além disso, esses anticorpos tem sido especialmente relacionados aos mecanismos de intensificação da infecção dependente de anticorpo (ADE), apresentando assim grande potencial de utilização como ferramenta no entendimento da patogênese do vírus.

Ainda em relação ao *Western-Blot*, foi possível observar que o AcM E4 reconheceu fortemente a prM, e fracamente outras 2 bandas, dentre as quais, uma acreditamos se tratar do precursor C/prM, especialmente pelo fato de a mesma apresentar epítomos reconhecidos por este AcM (Figura 18). Os AcM B1 e B4 reconheceram além das frações 24 kDa, frações correspondentes a Envelope e NS1 respectivamente, mostrando a presença de epítomos compartilhados entre proteínas virais. Baseado nesses resultados, pode-se inferir que a probabilidade de serem detectados AcM monoclonais anti-NS1, com o desenho experimental utilizado, é de 10% (1 em 10 AcM). E tomando como base essa proporção, é possível que, dos hibridomas produtores de AcM durante o processo de triagem, apenas 4 dentre os 39 sobrenadantes com D.O. acima de 0,200, apresentariam AcM capazes de reconhecer essa proteína.

Assim como no *Dot-Blot*, houve mais uma vez reconhecimento do padrão, nesse caso, uma banda na altura de 105 kDa do extrato de células C6/36 não infectadas (Figura 18). Esses resultados revelaram mais uma vez que os AcM produzidos reagem cruzadamente com as células do hospedeiro, provavelmente pela presença de sequencias repetidas entre as proteínas virais e células C6/36. A identificação dos epítomos de reação cruzadas entre células hospedeiras e vírus geram importantes informações a respeito do DENV e sua interação patógeno-hospedeiro (SAUTTO et al., 2013; YACOUB et al., 2013). Muitos candidatos a vacinas, sejam atenuadas, inativadas, proteínas recombinantes ou quimeras com proteínas de DENV-YFV, contém sequencias de prM, podendo levar a uma resposta indutora da infecção

(ADE), comprometendo portanto o efeito protetor (YACOUB et al., 2013; DEJNIRATTISAI et al., 2010). Uma vez que são conhecidos esses epítomos de reatividade cruzada é possível realizar uma melhor avaliação de regiões que devem ser evitadas no desenvolvimento de vacinas, ou que possam ser bloqueadas no caso de desenvolvimento de antivirais (SAUTTO et al., 2013, WAHALA et al., 2011; DEJNIRATTISAI et al., 2010, JULANDER, 2011).

A fim de um maior aprofundamento nas análises de aplicabilidade dos AcM como ferramenta diagnóstica, foi realizado o isolamento de uma nova cepa do DENV-4 (DENV-4/2014), a partir de soro infectado, em células C6/36; analisado através da IFI. A análise de IFI mostrou a capacidade do AcM E4 em reconhecer um novo isolado de DENV-4, obtido a partir de soro de paciente, podendo ser observado claramente a identificação de proteínas virais no citoplasma celular, região onde ocorre a replicação viral (Figura 19). Portanto, enfatiza-se a capacidade do reconhecimento do DENV-4 pelo AcM E4, em cultura de células, podendo ser utilizados em pesquisas para a identificação desse sorotipo, além de mais uma vez ter sido demonstrado seu potencial uso como ferramenta diagnóstica em isolamento viral.

Até o momento, a produção de AcM no país tem sido extremamente limitada, o que gera a necessidade de importação desses insumos, especialmente em relação ao diagnóstico da dengue. O fato desses AcM terem sido produzidos frente a uma cepa viral isolada do DENV-4 circulante no país podem vir a gerar anticorpos com maior sensibilidade e especificidade frente a essas cepas. Nosso estudo é o primeiro a produzir anticorpos monoclonais para o DENV-4 no Brasil, desde a reintrodução do mesmo em território nacional.

Os resultados obtidos servirão como base para o aprofundamento em estudos adicionais a respeito da sensibilidade e especificidade dos AcM, comparadas a outras técnicas padrões; além de análises de reatividade cruzada frente aos outros sorotipos e vírus da mesma família; e capacidade de neutralização. Por fim, a caracterização preliminar mostrou que os AcM produzidos identificam o DENV-4, com diferentes padrões de reatividade, evidenciando seu potencial de utilização como insumo biotecnológico; sejam em estudos a respeito do vírus e sua patogênese, sejam em uma possível aplicação como ferramenta imunodiagnóstica.

8.0-CONCLUSÕES

Os AcM produzidos foram capazes de reconhecer diferentes antígenos do DENV-4;

Todos os AcM produzidos neste estudo reagem positivamente com antígenos de DENV-4 através dos testes de ELISA , *Dot-Blot*, e IFI

A diluição ótima dos AcM, obtida através da titulação dos líquidos ascíticos, nos ensaios do tipo ELISA, variaram de entre 1/16 a 1/64.

A concentração ótima de detecção do antígeno viral, em extrato proteico de células C6/36 infectadas, no *Dot-Blot*, foi de 10µg para os AcMs F10, D2, H12, H1, B4 e B1; e 5µg para o E4 .

Foi demonstrado através de *Dot-Blot* e *Western-Blot*, que os AcM produzidos foram capazes de reconhecer antígenos no extrato de células C6/36 não infectadas.

Os pesos moleculares das proteínas virais encontradas são compatíveis com o descrito na literatura para as proteínas precursoras de prM, assim como das proteínas NS1, E e o dímero E/E;

Foi possível demonstrar o reconhecimento de bandas proteicas através de *Western-Blot* em condições desnaturantes pelos AcM F10, B1, B4, H1, E4, H12,D2 e C11, sugerindo que os epítomos reconhecidos são lineares;

Foi possível demonstrar o reconhecimento de banda proteica compatível com a prM, através do *Western-Blot*, pelos AcMs E4,B1,F10,B4,D2,H1 e C11;

O AcM H12 reconheceu, nas mesmas condições, banda proteica de peso compatível com a proteína E/E.

Foi possível demonstrar que todos os AcMs foram capazes de reconhecer antígenos do DENV-4 através de teste de IFI, sugerindo uma possível utilização destes AcMs no diagnóstico por essa metodologia.

Através dos ensaios de aplicabilidade, mostrou-se a capacidade do AcM E4 em reconhecer antígenos do DENV-4/2014, sugerindo a possível utilização dos mesmos no isolamento viral.

A caracterização preliminar mostrou o potencial de utilização desses AcM sejam em estudos a respeito do vírus e sua patogênese, sejam em uma possível aplicação como ferramenta imunodiagnóstica.

9.0- REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. PILLAI, S.; **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
- ALWIS, R.; BELTRAMELLO, M.; MESSER, W. B.; et al. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.6,n.6, p.1188, 2011.
- ANDERSON, R. **Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses**. In: Chambers, T. J; Monath, T. P. The Flavivirus: structure, replication and evolution, 1° Ed, p. 229-274, 2003.
- ANTHONY, R. S.; STEVEN, H. H. Evaluation of a new West Nile Virus lateral-flow rapid IgM assay. *J. Virol. Methods* , v. 157 p. 223–226, 2009.
- ANTÚNEZ, L. M. P. ; VERA, M. Á.; HERNÁNDEZ, M. S.; et al. Anticuerpos monoclonales al virus dengue 4: espectro de reactividad a los 4 serotipos del dengue. **Rev cubana med trop**, v. 52,n .2, p.119-125, 2000.
- AVIRUTNAN, P., N. PUNYADEE, S. NOISAKRAN, et al.. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **J. Infect. Dis.** v. 193, p. 1078–1088, 2006.
- AZEVEDO, A, S; YAMAMURA, A, M, Y; FREIRE, M, S, et al. DNA Vaccines against Dengue Virus Type 2 Based on Truncate Envelope Protein or Its Domain III. **PLoS ONE**.; v.6, n.7, 2011.
- AZEVEDO, A. S. **Desenvolvimento de vacinas de DNA contra o vírus da dengue baseadas na proteína do envelope viral**. 2011, 200 f. Tese (Doutorado em biologia celular e molecular)- Intituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- BAHIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Saúde do Estado da Bahia (SESAB). **Nota Técnica Dengue - Alerta para epidemia e aumento da letalidade**. Disponível em<http://www1.saude.ba.gov.br/entomologiabahia/dengue/NOTA_TECNICA_ALERTA_2012_assinado.pdf> Acesso em 16 de dezembro de 2014.
- BARBOSA, J.; VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Dengue: situação epidemiológica e estratégias de preparação para 2014**. Ministério da saúde, Brasil, 2013.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estud. av.**, São Paulo , v. 22, n. 64, 2008.
- BARTH, O. M. **Atlas of Dengue Viruses Morphology And Morphogenesis**. 20.ed. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz , 2010.

BELTRAMELLO, M.; WILLIABRASIL, K.L.; SIMMONS, C.P.; 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**, v.8, n.3, 271–283, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde**. Série A. Normas e Manuais Técnicos, nº 176, Brasília, 2002, p.20.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014. Disponível em < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue> >ISSN 2358-9450 , Boletim Epidemiológico, Volume 46 , Nº 3 – 2015

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SIQUEIRA JR; J. B.; VINHAL, L. C.; SAID, R. F. C.; et al. **Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de Controle da Dengue, Departamento de Análise de Situação em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011, 372 p.

CABEZAS, C. Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. **Rev. perú. med. exp. salud publica**. vol.22, n.3, pp. 212-228, 2005

CHAMBERS, T.,J; HAHN, C.S; GALLER, R. ; et al. Flavivirus Genome, Organization, Expression and Replication. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 40, p. 649- 688, 1990.

CECILIA, D., KAKADE, M. B., BHAGAT , A. B., et al.Detection of dengue-4 virus in pune, western india after an absence of 30 years-its association with two severe cases. **Virol J**; v. 8 n. 46, 2011.

CLYDE, K.; KYLE, J; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v.80, n.23, p: 11418-11431,2006.

CHIARELLA, P; FAZIO, V. M. Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production. **Biotechnology Letters** , v. 30,n. 8, p 1303-1310, 2008.

DASH P. K., SHARMA S., SRIVASTAVA A., et al. Emergence of dengue virus type 4 (genotype I) in India. **Epidemiol Infect**; v. 139, n.6, p. 857-861, 2011.

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

DEJNIRATTISAI, W; WONGWIWAT, W; SUPASA, S; et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. **Nat Immunol**. V. 16, n. 2, p. 170-172, 2015.

EDGIL, D.; POLACEK, C.; HARRIS, E. Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. **Journal Of Virology**, V. 80, N. 6, p. 2976–2986, 2006.

FALCONAR, A. K. I. Monoclonal antibodies that bind to common epitopes on the dengue virus type 2 nonstructural-1 and envelope glycoproteins display weak neutralizing activity and differentiated responses to virulent strains: implications for pathogenesis and vaccines. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 3, p. 549–561, 2008.

FALCONAR, A.K I, YOUNG, P.R. Production of dimer-specific and dengue virus group cross-reactive mouse monoclonal antibodies to the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. **J Gen Virol**. v. 72, p. 961-965, 1997.

FERREIRA, D. **Caracterização Metabólica e Cinética do Cultivo de três Híbridomas para a produção de imunoglobulinas com especificidade a antígenos eritrocitários para uso hemoterápico** 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em engenharia bioquímica)-Departamento de Engenharia química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 45, n. 3, p.285-285, 2012.

FIGUEIREDO, R. M., PINTO DE FIGUEIREDO, R. M.; NAVECA, F. G, et al. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n.4, p. 667-9, 2008.

FLAMAND, M.; F. MEGRET, M.; MATHIEU, J.; et al. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **J. Virol**. v.73, p.6104–6110, 1999.

FONTES,L.,V.,Q.,**produção de anticorpos monoclonais contra rota vírus bonivos, salvador**. 2003.Dissertação (Mestrado em Imunologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador.

FORSHEY B. M., MORRISON A. C., CRUZ, C.; et al. Dengue virus serotype 4, northeastern Peru, 2008. **Emerg Infect Dis.**; v. 15, n.11.; p.1815-1818, 2009.

GANDER, J. E. Gel protein stains: glycoproteins. **Methods Enzymol**. v.104, n.447, 1984.

GEBHARD, L.G; INCICCO, J.J.; SMAL, C; et al.. Monomeric nature of dengue virus NS3 helicase and thermodynamic analysis of the interaction with single-stranded RNA. **Nucleic Acids Res.**; v.42 n.18, p.11668-11686, 2014.

GHOSH, L D. Dengue vaccines: Challenges, development, current status and prospects. **Indian J Med Microbiol**, v.33, n.1, p.3-15. 2015.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, V. 371, N. 9611, p500–509, 2008.

GOWRI, S. S; BALAJI, T.; VENKATASUBRAMANI, K.; et al. .Dengue NS1 and prM antibodies increase the sensitivity of acute dengue diagnosis test and differentiate from

- Japanese encephalitis infection. **Journal of Immunological Methods**, V. 407, P. 116–119, 2014.
- GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clin. Microbiol Rev.**, v. 11. n.3, p.480-480, 1998.
- GUBLER DJ. IN: MAHY BWJ, VAN REGENMORTEL MHV. **Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology**. Boston: Academic Press, (2010). Capítulo: Dengue viruses. , p. 372–82.
- GUZMAN, M.G., HALSTEAD, S.B; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D.J. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v.8 , n.12, p. S7–S16, 2010.
- HALSTEAD, SB. Dengue virus-mosquito interactions. **Annu Rev Entomol**. N. 53, p. 273-291, 2008.
- HEINZ, F.X.; ALLISON, S.L. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. **Adv. HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S.** The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n.1, p. 19–28, 2003.
- HUANG, K. J; YANG, Y.C; LIN, Y.S et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **J.Immunol**. v. 176, p. 2825-2832, 2006.
- HUI, S.W; STENGER, D.A. Electroporation of cells: hybridoma production by electroporation and polyethylene glycol. **Methods in Enzymol**. v. 220, p.212-227, 1993.
- Virus Res**. v. 55, p. 231-269, 2000.
- JULANDER JG, PERRY ST, SHRESTA S. Important advances in the field of anti-dengue virus research. **Antivir Chem Chemother**. v. 21, n.3, p.105-116, 2011.
- KALITZKY, M.; BOROWSKI, P. **Molecular Biology of the Flavivirus**. 3^a ed. United Kingdom: Horizon Scientific Press, 2006, p., 380.
- KÖHLER, G; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. V. 256, p. 495 – 497, 1975.
- KUHN RJ, ZHANG W, ROSSMANN MG, et al.. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. **Cell**. V.108, p.717-725, 2002.
- LAEMMILI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANCIOTTI, R.S; CALISHER, C.,H; GUBLER D.,J; et al.. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**. v.30, n.3, p.545-51,1992.

- LEI, H. Y., YEH, T. M.; LIU, H. S.; LIN, Y. S; et al. Immunopathogenesis of dengue virus infection. **J Biomed Sci.** v.8, n.5, p.377-388, 2001.
- LI D. S., LIU W., GUIGON A.; et al. Rapid displacement of dengue virus type 1 by type 4, Pacific region, 2007-2009. **Emerg Infect Dis.**, vol. 16, n.1; p.123-125,2010.
- LI, L; LOK, S.; YU, I ; et al. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. **Science.** v. 319, n.5871, p.1830-1834, 2008.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. **Flaviviridae: the viruses and their replication.** In: KNIPE D. M, HOWLEY PM, editors. Fields' Virology. (2001). p. 991-1042.
- LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. **Flaviviridae: the viruses and their replication.** In KNIPE, D. M, HOWLEY PM, editors. Fields Virology (2007), p. 1101-1152.
- LINDENBACH, B.D., RICE, C.M. **Molecular Biology of Flavivirus.** In: CHAMBERS T.J. & MONATH T.P. Advances in Virus Research: The Flavivirus:structure, replication and evolution. California (2003), Academic Press. v. 59, p. 23-61.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; HONÓRIO, N. A . ; CASTRO, M. G; et al. Dengue Virus Type 3 Isolation from *Aedes aegypti* in the Municipality of Nova Iguaçu, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, n.6, p.799-800, 2002.
- MACHADO , J. M.; OLIVEIRA, T. A.; ZÓBOLI, A. P.; et al. Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de proteínas não estruturais da dengue.**Biochemistry and Biotechnology Reports.** v. 2, n. 2, p. 73-75, 2013.
- MACKENZIE, J.M; MALCOLM, K. J.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. **Virology.** V. 220, n. 1, p. 232–240, 1996.
- MACKENZIE,J.M B.; KHROMYKH,A.A.; JONES,M.K.; et al. .Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjinnon-structural proteinsNS2AandNS4A.**Virology**, v.245, p.203–215, 1998.
- MARQUES, C.H. Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica. 2005. 109f. Dissertação (Mestrado) - Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- MARTINA, B. E. E. Clinical course, pathogenesis and treatment of dengue: An overview., **Culture** , v.32 , n.1, p. 1-4, 2011.
- MATHER, J.P.; ROBERTS, P.E. **Introduction to cell and tissue culture: theory and technique.** Plenum press, New York, 1998.

MAZZAROTTO, G. A. C. A. **Geração e Caracterização de Anticorpos Monoclonais para Dengue e Hantavírus – Desenvolvimento de Insumos com Potencial Biotecnológico Aplicado a Saúde**. 2009. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) Universidade Federal do Paraná – Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Curitiba.

MISTRETTA, V. I.; CAVALIER, E.; COLLETTE, J.; et al. Production of monoclonal antibodies. **Rev Med Liege**. v. 64, n. 5-6, p. 248-252, 2009.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**. v. 427, n. 6972, p. 313-319, 2004.

MORAIS, R. Brasil tem 340 cidades com risco de surto de dengue, informa ministério. G1. Distrito Federal, 12, março, 2015, disponível em: <http://g1.globo.com/bemestar/dengue/noticia/2015/03/brasil-tem-340-cidades-em-situacao-de-risco-de-dengue-informa-ministerio.html>. Acesso: 10/04/2015.

MONATH, T. P.; TSAI, T. F. **Flaviviruses**. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone, 1997:1133–1134.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais**. Ed. Roca. São PAULO, 2008

MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R. J. & ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Rev. Microbiol**, v. 3, n.1, p.13–22, 2005.

MUSTAFA, M.S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Med J Armed Forces India**. V. 71, n.1, p.67-70, 2015.

MORENS, D. M. ; VENKATESHAN, C. N. ; HALSTEAD, S. B Dengue 4 Virus Monoclonal Antibodies Identify Epitopes that Mediate Immune Infection Enhancement of Dengue 2 Viruses. *J. gen. Virol.* n. 68, p, 91-98. 1987.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.205-207, 2002.

NELSON, P. N.; REYNOLDS, G. M.; WALDRON, E. E.; et al. Monoclonal antibodies. **Molecular Pathology**, v.53, n.3, p.111–117, 2000.

NODA, M.; MASRINOUL, P.; PUNKUM, C.; et al. Limited cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies against Dengue virus capsid protein among four serotypes. **Biologics : Targets & Therapy**, v.6, p. 409–416, 2012.

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

NOGUEIRA, R.M.R; MIAGOSTOVICH, M.P.; FILIPPIS, A.M.B; et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol.96, n.7, p. 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R.M.R; MIAGOSTOVICH, M.P.; LAMPE, E.; SCHATZMAYR, H.G. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol.85, n.2, p. 253-253,1990.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **News & Analysis Tropical Medicine**. v. 342, n. 6157, p. 415, 2013.

PANDEY SH. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. **Int J Pharm Sci Rev Res** . v.1, n.2, p. 88–94, 2010.

PERERA R.; KUHN R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Curr Opin Microbiol**. V.11, n.4, p.369-377,2008.

PERERA-LECOIN M, MEERTENS L, CARNEC X, et al. Flavivirus Entry Receptors: An Update. **Viruses**; v. 6, n.1, p. 69-88, 2014.

PIERSON, Ted . Viral Pathogenesis Section, Laboratory of Viral Diseases. 02 de Novembro de 2012, national institute of allergy and infectious diseases, Estados Unidos, disponível em: <http://www.niaid.nih.gov/Pages/default.aspx> .

PINHO, A., C.,O.**Diagnóstico e caracterização molecular do vírus dengue circulante na cidade de Salvador**,2013, 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) ,Universidade Federal da Bahia, Salvador.

PITAKSAJAKUL, P.; BENJATHUMMARAK, S.; PIPATTANABOON, C.; et al.. Antibody germline characterization of cross-neutralizing human IgGs against 4 serotypes of dengue virus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Vol.446, n.2, p.475–480, 2014.

RAJAMANONMANI, R., NKENFOU, C., CLANCY, P., et al. On a mouse monoclonal antibody that neutralizes all four dengue virus serotypes. **The Journal of General Virology**, v. 90, n.4, 799–809, 2009.

RANDOLPH, V. B.; WINKLER, G.; STOLLAR, V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. **Virology** v.174, p.450–458,1990.

RAVIPRAKASH K, KOHEL TJ, EWING D; *et al.* Immunogenicity of dengue virus type 1 DNA vaccines expressing truncated and full length envelope protein. **Vaccine** , v.18, n.24, 26-34, 2000.

REID, S.M., FERRIS, N.P., BRÜNING, A.; et al. Development of a rapid chromatographic strip test for the pen-side detection of foot-and-mouth disease virus antigen. **J. Virol. Methods**, v. 96, p.189–202, 2001.

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

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

- RICO-HESSE R, HARRISON LM, SALAS RA, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. , **Virology**, v.230, p.244–251, 1997.
- RICO-HESSE, R. Dengue virus evolution and virulence models. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 11, p. 1.462-1466, 2007.
- RICO-HESSE, R.. Dengue virus and transmission determinants. **curr top microbial immunol**, v 338, p. 45-55, 2010.
- SANTOS, R.V.; LIMA, P., M., G.; NITSCHKE, A.HARTH, F.; et al.. Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais . **Rev. bras. alerg. imunopatol.** v. 29, n.2, 2006.
- SAUTTO, G.; MANCINI, N.; GORINI, G; .et al.. Possible Future Monoclonal Antibody (mAb)-Based Therapy against Arbovirus Infections. **BioMed Research International**, n. 838491, 2013.
- SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DA BAHIA (SESAB). Orrico, A. Boletim Dinâmico da Dengue - Bahia 2015. 10 de Abril de 2015. Disponível em: http://www1.saude.ba.gov.br/entomologiabahia/dengue/graficos_objetos_bahia.php
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde (BRASIL). Balanço Dengue: Semana Epidemiológica 1 a 26 de 2011. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
- SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DE SANTA CATARINA, Santa Catarina registra o primeiro caso autóctone de dengue em 2014, Itajaí, 31 de julho de 2014, disponível em: <http://portalses.saude.sc.gov.br/> Acesso em: 10, abril, 2015.
- SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, FUMEGALLI, A. Vigilância divulga novos números da dengue no Estado. 24, março, 2015. Disponível em: <http://www.rs.gov.br/conteudo/213278/vigilancia-sanitaria-divulga-novos-numeros-da-dengue-no-estado>. Acesso: 10, abril, 2015.
- SHOCHAT, S.L. S. G.; KUKKARO, G. G.; BIUKOVIC, G.; et al. Dengue Maturation Surface Protein Rearrangement during Plays an Important Role in the Virus The Stem Region of Premembrane Protein Protein Structure and Folding. **J. Biol. Chem.** N.287, 2012.
- SHRESTHA B.; BRIEN, J. D; SUKUPOLVI-PETTY, S; et al. The Development of Therapeutic Antibodies That Neutralize Homologous and Heterologous Genotypes of Dengue Virus Type 1. **PLoS Pathog.** v.6, n. 4, 2010.
- SILVA, L. K.; BLANTON, R. E., PARRADO, A. R., et al. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *European Journal of Human Genetics*, v. 18, n. 11, p. 12221-1227, nov. 2010.

SITTISOMBUT, N., P. KEELAPANG, P. MALASIT. 2006. Functional role of prM glycoprotein in dengue virus replication, p. 169-189. In M. Kalitzky and P. Borowski (ed.), *Molecular biology of the flavivirus*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.

SONG, K.Y.; ZHAO, H.; JIANG, Z.Y.; et al. A novel reporter system for neutralizing and enhancing antibody assay against dengue virus. **BMC Microbiology**, v. 14, n.44, 2014.

STROTTMANN, D. M. **Neuroadaptação de vírus dengue em modelo murino: Identificação de marcadores moleculares**. 2008.101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SUSCOVICH, T. J; ALTER, G. In situ production of therapeutic monoclonal antibodies. **Expert Review of Vaccines**, , v. 14, n. 2 : p.205-219, 2015.

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

WANG, S. H., SYU, W. J. & HU, S. T. Identification of the homotypic interaction domain of the core protein of dengue virus type 2. **J Gen Virol**, n. 85, p. 2307–2314, 2004.

WANG, S.; RUNTAO, H. E.; ROBERT, A. PrM- and Cell-Binding Domains of the Dengue Virus E Protein. **Journal of Virology**, v. 73, n. 3, p. 2547–2551, 1999.

WEAVER, S. C; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infect Genet Evol.** v.9, n.4, p.523-540, 2009.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A.P.; et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews**, v. 5, n. 7, p. 518-128, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020. Geneva: **WHO Press**; 2012.

WU, S. J.; GROUARD-VOGEL G; SUN W; et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine*, v. 6, p. 816-820, 2000.

YACOUB, S.; MONGKOLSAPAYA, J. SCREATON, G. The pathogenesis of dengue. **Curr Opin Infect Dis**, v.26, n.3, p.284–289, 2013.

YOUNG, P. R.; HILDITCH, P.A. ; BLETCHLY, C. et al. An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients . **Journal of clinical microbiology** , v. 38, n. 3 p. 1053–1057, 2000.

UMAREDDY I B, C. A.; SAMPATH, A. G. F; VASUDEVAN, S. G. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **J Gen Virol.** V.87, n.9, p.2605-2614, 2006.

UMAREDDY, I; PLUQUET, O; WANG, Q,Y. ; et al. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. **Virolog J.**v.4, n.91, 2007.

VASCONCELOS, P. F. C; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A; PINHEIRO, FRANCISCO P; et al. Arboviruses Pathogenic for man in Brazil In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A; VASCONCELOS, P. F. C; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Belém, Instituto Evandro Chagas,. p.72-99, 1998.

VAZQUEZ ,Y.; PUPO-ANTÚNEZ, M.; VAZQUEZ, S., et al. Monoclonal antibody to dengue capsid protein: Its application in dengue studies. **mAbs**. v.1, n.2, p.157-162, 2009.

VERDEAL, J. C. R.; COSTA FILHO, R.; VANZILLOTTAI, C. et al. Guidelines for the management of patients with severe forBRASIL of dengue. **Rev. bras. ter. intensiva**, v. 23, n. 2, 2011 .

VOORHAM, J. M .S. A possible fifth dengue virus serotype. **Ned. Tijdschr. Geneeskd**. V. 158, n. 7946, 2014.

XIE, X.; ZOU, J.; QING-YINWANG; et al. Generation and characterization of mouse monoclonal antibodies against NS4B protein of dengue virus, **Virology**. V. 450-451, p.250–257,2014.

ZANLUCA, C; MAZZAROTTO, G. A. C. A; BORDIGNON, J; et al. Development, Characterization and Application of Monoclonal Antibodies against Brazilian Dengue Virus Isolates. **PLoS ONE**, v. 9, n.11, 2014.

10.0- ANEXO

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **044/2013**, intitulado **“Produção de anticorpos monoclonais para o vírus da Dengue tipo 4”**, sob a responsabilidade da Professor Doutor Gúbio Soares Campos, lotada no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **16de julho de 2013**.

Salvador, 16 de julho de 2013.

Profª Dra. Songeli Menezes Freire
Coordenadora da CEUA-ICS