

FLÁVIA VIANA FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**RT-PCR QUANTITATIVA PARA DETECÇÃO
DE DENV EM LARVAS DE AEDES SP**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Microbiologia
do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial à obtenção do
título de mestre em Microbiologia

Orientadora: Profa. Erna Geesien Kroon

UFMG

2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Erna pela orientação e confiança. Sua dedicação e ensinamentos, durante o desenvolvimento deste trabalho, foram muito importantes. É um orgulho muito grande ser sua aluna. Obrigada por tudo!

Aos demais professores do Laboratório de Vírus: Cláudio Bonjardim, Paulo Peregrino e Giliane Trindade, pelos ensinamentos e bom convívio.

À todo o grupo de Dengue: muito obrigada por tudo o que vocês fizeram. A ajuda de cada um foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço em especial à Lelê e à Ana P: obrigada pelos ensinamentos e pelo carinho! Agradeço também ao Breno, pela imensa paciência com as larvinhas.

Muito obrigada ao JR, tia Ângela, Deza, Ildinha e Rose. A dedicação de todos vocês sempre foi fundamental para todos nós!

A toda turma do Laboratório de Vírus: é um prazer trabalhar com todos vocês. Obrigada a todos por toda a atenção, paciência e principalmente pelo maravilhoso ambiente de trabalho. A diversão com vocês é sempre garantida. Guardo cada um de vocês pra sempre comigo!

Um agradecimento especial a Gigi e a Alice: muito obrigada pelo apoio e o imenso incentivo em tudo! A amizade de vocês é muito importante pra mim!

A querida turma do mestrado, em especial a Ló, Matheus, Marina, Pedro, Carlinha e Rafael: muito obrigada por fazerem dos desafios uma imensa diversão!

Aos meus queridos amigos biólogos: meu eterno CB8, vocês sempre foram meu incentivo na vida científica. As festas e conversas sempre foram fundamentais, afinal, como sempre disse nosso velho ditado: eu amo vocês!!!

Aos meus grandes amigos, em especial a Blackinha e Cedinha: com vocês tudo fica melhor, afinal os grandes e verdadeiros amigos são pra vida inteira!!!

Ao Thiago, pela paciência, companheirismo, pelo grande incentivo e pelo imenso carinho!

À toda minha família, Paula e Tunica por todo apoio, companheirismo e por fazerem meus dias mais feliz!

Aos meus eternos amigos: meu pai e minha mãe. Vocês são as minhas forças, coragem e determinação. Muito obrigada pela paciência, pelos abraços, pela coragem e pelo imenso amor. Obrigada por ensinarem a vida e por me darem força para continuar lutando. Tenho muito orgulho de ser sua filha. Amo vocês!

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da doença	3
1.2 Família <i>Flaviviridae</i>	3
1.2.1 Classificação	3
1.2.2 Morfologia	4
1.2.3 Estrutura do genoma	5
1.2.4 Ciclo de multiplicação do <i>Dengue virus</i>	7
1.2.5 Patogênese, manifestações clínicas e tratamento	9
1.2.6 Ciclo de transmissão	12
1.3 Infecção do DENV no vetor	14
1.3.1 Biologia do vetor	17
1.3.1.1 <i>Aedes aegypti</i>	21
1.3.1.2 <i>Aedes albopictus</i>	22
1.4 Epidemiologia, controle e prevenção da doença	23
1.5 Metodologia de estudo para o <i>Dengue virus</i>	27
1.5.1 PCR quantitativa	29

II. JUSTIFICATIVA 32

III. OBJETIVOS 35

3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos específicos	35

FLUXOGRAMA DE TRABALHO 36

IV. MATERIAIS E MÉTODOS 37

4.1 Coleta e armazenamento das amostras	37
4.2 Extração de RNA viral	39
4.3 Transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	39
4.4 Clonagem da região 5'UTR do <i>Dengue virus</i> em sistema procarioto	42
4.4.1 Clonagem em pGEM-T	42
4.5 Sequenciamento e análise das sequências de DNA	44
4.6 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)	45
4.6.1 Preparo de uma pré- mistura	45

V. RESULTADOS	46
5.1 Identificação e caracterização molecular das amostras	46
5.1.1 Diferenciação morfológica e identificação dos “pools” de larvas de <i>Aedes sp.</i>	46
5.2 Detecção dos vírus por RT-PCR empregando iniciadores para a região 5´UTR do DENV	48
5.2.1 Análise da amplificação do DNA da região 5´UTR do DENV usando vírus e “pools” de larvas	48
5.2.2 Teste de sensibilidade de temperatura	52
5.2.3 Amplificação do DNA da região 5´UTR clonada em pGEM-T	53
5.3 Desenho de iniciadores para o gene constitutivo glutamino sintetase em <i>Aedes sp.</i>	57
5.4 Padronização da reação quantitativa em cadeia da polimerase (qPCR)	60
5.4.1 Variação das concentrações dos iniciadores para a região 5´UTR	60
5.4.2 Detecção dos vírus por PCR quantitativo empregando iniciadores para a região 5´UTR do DENV	64
5.4.3 Avaliação da eficiência da PCR quantitativa	66
5.4.4 Eficiência da PCR quantitativa usando cDNA sintetizado com diferentes iniciadores	69
5.4.5 Qualidade da amplificação do DNA após diluição do cDNA em PCR quantitativo	72
5.4.6 Teste da amplificação dos iniciadores normalizadores da PCR quantitativa em pools de larvas e mosquito de <i>Aedes sp</i>	74
5.4.7 Análise quantitativa do número de cópias do genoma do DENV em “pools” de larvas de <i>Aedes sp</i>	77
5.4.7.1 Construção da curva padrão	77
5.4.7.2 Detecção de número de cópias de genoma de DENV nos “pools” de larvas de <i>Aedes sp</i> coletadas na cidade de Belo Horizonte	81
VI. DISCUSSÃO	92

VII. CONCLUSÕES	102
VIII.PERSPECTIVAS	104
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Reinfestação das Américas com o vetor <i>Aedes aegypti</i>	2
FIGURA 2: Morfologia e estrutura do DENV	4
FIGURA 3: Representação esquemática das características do genoma do <i>Dengue virus</i>	7
FIGURA 4: Diagrama do ciclo de multiplicação do DENV	9
FIGURA 5: Desenvolvimento da infecção por DENV	11
FIGURA 6: Ciclo de transmissão do DENV	13
FIGURA 7: Percurso da infecção do DENV no mosquito vetor	14
FIGURA 8: Modelo de infecção do mosquito pelo DENV	15
FIGURA 9: Principais diferenças morfológicas das larvas de <i>A.aegypti</i> e <i>A.albopictus</i>	18
FIGURA 10: Barreiras naturais de infecção pelo DENV	20
FIGURA 11: Mapa de risco mostrando a situação de risco da dengue em 2011	25
FIGURA 12: Amplificação da região 5'UTR do DENV empregando iniciadores específicos	38

FIGURA 13: Amplificação de DNA da região 5'UTR do DENV por RT-PCR em "pools" de larvas	50
FIGURA 14: Avaliação da eficiência de amplificação de DNA em diferentes temperaturas de pareamento testadas em gradiente	53
FIGURA 15: Detecção do inserto 5'UTR no vetor pGEM por PCR	56
FIGURA 16: Alinhamento de sequência de DNA com o RNAm do gene da glutamino sintetase de <i>Aedes sp.</i>	58
FIGURA 17: Características dos iniciadores normalizadores específicos ao gene de referência da glutamino sintetase do <i>Aedes sp.</i>	59
FIGURA 18: Teste de concentração ideal dos iniciadores na PCR quantitativa	62
FIGURA 19: Análise da amplificação empregando os iniciadores 5'UTR dos 4 sorotipos do DENV	65
FIGURA 20: Eficiência da qPCR durante a montagem da curva padrão	68
FIGURA 21: Ciclos de amplificação e temperatura de dissociação de cDNA gerados com iniciadores randômicos e 5'UTR de DENV	71
FIGURA 22: Análise da qualidade da amplificação da PCR em tempo real.	73
FIGURA 23: Avaliação da amplificação do gene da glutamino sintetase de <i>Aedes sp</i> empregando iniciadores normalizadores específicos	75
FIGURA 24: Amplificação do gene da glutamino sintetase em "pools" com diferentes quantidade de larvas de <i>Aedes sp.</i>	76
FIGURA 25: Teste de sensibilidade da curva padrão construída com reagentes produzidos no Laboratório	79

FIGURA 26: Teste de sensibilidade da curva padrão construída com o Master Mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems)	80
FIGURA 27: Análise quantitativa de cópias de DENV em 8 “pools” de larvas coletadas no mês de junho-semana 2.	84
FIGURA 28: Análise quantitativa de cópias de DENV em 9 “pools” de larvas coletadas no mês de junho-semana 2	85
FIGURA 29: Análise quantitativa de cópias de DENV em 6 “pools” de larvas coletadas no mês de junho-semana 2	86
FIGURA 30: Detecção de DENV em 8 “pools” de larvas coletadas no mês de outubro-semana 1	87
FIGURA 31: Detecção de DENV em 12 “pools” de larvas coletadas no mês de dezembro-semana 3	88
FIGURA 32: Detecção de DENV em 7 “pools” de larvas coletadas no mês de junho-semana 1.	89

LISTA DE TABELA

TABELA 1: Iniciadores utilizados para a amplificação da região 5'UTR	40
TABELA 2: Iniciadores utilizados para a amplificação do gene da glutamino sintetase do <i>Aedes sp</i>	40
TABELA 3: Identificação e quantificação dos "pools" de larvas	46
TABELA 4: Análise da presença de genoma de DENV nos "pools" de larvas de <i>Aedes sp</i> coletados em campo	90

LISTA DE ABREVIATURA

aa-aminoácidos

BOD - Baixo oxigênio dissolvido

C- Proteína do Capsídeo

CDC- Centro de Controle de Doença

cDNA- Ácido dextrribonucléico complementar

CG- Complexo de Golgi

Cl- Cloro

CMC – Carboximetilcelulose

CO₂ - Dióxido de carbono

dATP- dideoxiadenosina trifosfato

dCTP- dideoxicitosina trifosfato

dGTP- dideoxguanidina trifosfato

DENV- *Dengue virus*

DENV-1- *Dengue virus 1*

DENV-2- *Dengue virus 2*

DENV-3- *Dengue virus 3*

DENV-4- *Dengue virus 4*

DIM- Dose de mosquito infectante

DNA- Ácido dextrribonucléico

DTT- Ditioneitol

E- Proteína do Envelope

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA- Ensaio imunoenzimático

FC- Fixação do complemento

FD- Febre do dengue

FHD- Febre Hemorrágica do dengue

H₂SO₄- Ácido Sulfúrico

ICTV- internacional Committee on Taxonomy of Viruses

IgG- Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M

IH- inibição da hemaglutinação

JEV- Vírus da Encefalite Japonesa

Kb- Quilobases

KCl- Cloreto de potássio

kDa- Quilodáton

M- Proteína da Membrana

M- molar

MEM - Meio Mínimo de Eagle

MgCl₂- Cloreto de Magnésio

MVEV- Vírus da Encefalite de Murray Valley

µg - Micrograma

µL - Microlitro

mL – mililitro

mM- mili Molar

ng-nanograma

nm- nanômetro

NS1- Proteína não estrutural 1

NS2a- Proteína não estrutural 2a

NS2b- Proteína não estrutural 2b

NS3- Proteína não estrutural 3

NS4a- Proteína não estrutural 4a

NS4b- Proteína não estrutural 4b

NS5- Proteína não estrutural 5

ORF- Janela aberta de leitura (do inglês, “open read frame”)

PA- Pará

pb- pares de bases

PBS - Tampão fosfato salina

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PIE- Período de incubação extrínscico

Poli A - Poliadenina

prM- proteína de pré-membrana

qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

RdRp- RNA polimerase dependente de RNA

RE- Retículo Endoplasmático

RER - Retículo Endoplasmático Rugoso

RNA- Ácido ribonucléico

RNAm- Ácido ribonucléico mensageiro

RT-PCR - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SCD- Síndrome do Choque da Dengue

SFB - Soro fetal bovino

SLEV- Vírus da Encefalite de St. Louis

UFP - Unidades formadoras de placa

UI - Unidades internacionais

UFMG-Universidade Federal de Minas Gerais

URT- Região terminal não codificadora

WHO- Organização mundial de Saúde (do inglês "World Health Organization")

WNV- Vírus West Nile

YFV- Vírus da Febre Amarela

RESUMO

Dengue virus 1 a 4 (família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*) (DENV-1, 2, 3, 4), são responsáveis por estimados 50 milhões de casos anualmente. Infecções, ocasionadas por qualquer um dos quatro sorotipos, podem causar uma doença febril aguda e uma doença mais grave, muitas vezes fatal, caracterizada por hemorragias e síndrome do choque. O vírus é transmitido principalmente por mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que, quando infectados pelo DENV, transmitem o vírus ao hospedeiro no momento do repasto sanguíneo. Os mosquitos podem adquirir o vírus ao picar um indivíduo infectado, do macho para a fêmea (transmissão venérea) e através da progênie. A transmissão vertical só ocorre quando o vírus multiplica-se no ovariolo da fêmea e infecta os ovos. Por não existir uma terapêutica específica, o método mais eficaz de controle da doença é o combate direto ao vetor. Além disso, existem poucos estudos que abordam a competência vetorial, que é a capacidade do mosquito de infectar, manter a replicação e conseguir disseminar o vírus. Por isto que este trabalho teve como objetivo avaliar a carga viral de DENV de pools de larvas de *Aedes sp* coletados em Belo Horizonte- MG. A avaliação foi feita pela amplificação de DNA da região 5'UTR do DENV e como controle do gene da glutamino sintetase de *Aedes sp*, por qPCR. Para o desenvolvimento desta técnica foi testada uma mistura composta por reagentes que permitiu detectar e amplificar DENV em "pool" de larvas e até mesmo em uma única larva. Para a determinação do número de cópias de DENV por larvas, testes complementares deverão ainda ser feitos. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo indicam que foi possível detectar, através de uma técnica mais sensível, DENV em larvas de *Aedes sp*, e com perspectivas de uma quantificação dos números de cópias. Os estudos empregando esta metodologia serão importantes para avaliar a competência vetorial, indicando, através dos números de larvas infectadas, o risco de transmissão da dengue em uma determinada área e, dessa forma, auxiliar no controle e na prevenção da dengue no Brasil.

ABSTRACT

Dengue virus 1 to 4 (family Flaviviridae, genus Flavivirus) (DENV-1, 2, 3, 4), are responsible for an estimated 50 million cases annually. Infections caused by any of the four serotypes can cause an acute febrile illness and a more serious, often fatal, characterized by hemorrhage and shock syndrome. The virus is mainly transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, when DENV-infected, transmit the virus to the host at the time of blood meal. Mosquitoes may acquire the virus by biting an infected person, male to female (venereal transmission) and through the progeny. Vertical transmission occurs only when the virus multiplies in the ovariole of the female and infected eggs. Because there is no specific therapy, the most effective method of disease control is direct combat the vector. In addition, there are few studies addressing vector competence, which is the ability to infect mosquitoes, and to keep replicating the virus spread. Why this study was to evaluate the viral load of DENV pools of *Aedes sp* collected in Belo Horizonte-MG. The evaluation was done by amplification of DNA from the 5'UTR region of DENV and the control of glutamine synthetase gene from *Aedes sp* by qPCR. To develop this technique was tested a mixture composed of reagents that detect and amplify DENV allowed in pool of larvae and even a single larva. To determine the number of copies of DENV by larvae, additional tests should still be made. Thus, the results of this study indicate that it was possible to detect, through a more sensitive technique, DENV on *Aedes sp*, and with prospects for a quantification of the numbers of copies. Studies using this methodology will be important to assess vector competence, stating, on the numbers of infected larvae, the risk of dengue transmission in a given area and thus assist in the control and prevention of dengue in Brazil.

I. INTRODUÇÃO

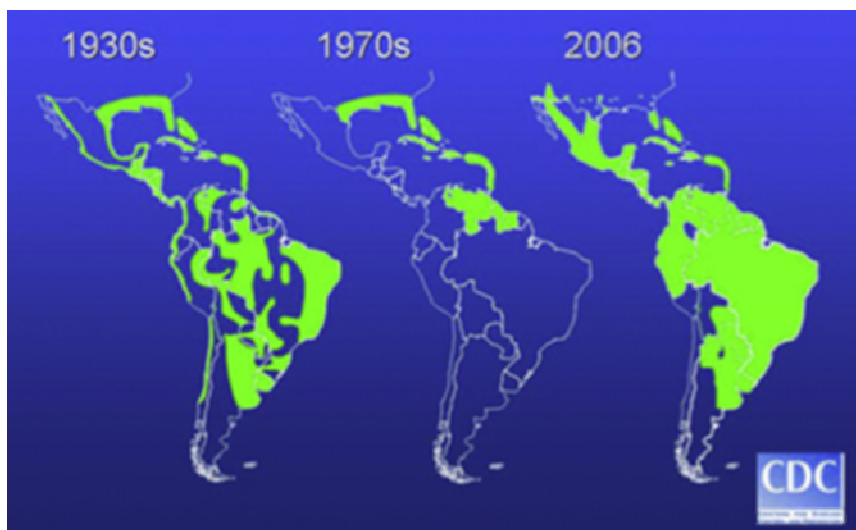
1.1 Histórico da doença

Embora os primeiros registros de casos de dengue tenham ocorrido em 1779 e 1780 na África, Ásia e América do Norte, existem dados de doenças causadas por insetos associados à água registrados na Enciclopédia chinesa (265 a 420 a.c). Antes do século XVIII, surtos dessa doença alcançaram uma ampla
5 distribuição geográfica e o início das grandes epidemias. As destruições ecológicas no sudeste asiático e no pacífico, durante a segunda Guerra Mundial, serviram como condições ideais ao aumento da transmissão de arboviroses e, foi nesta região que surgiram as primeiras epidemias. A transmissão do vírus pelo mosquito *Aedes aegypti* foi descrita, pela primeira
10 vez, por Bancroft em 1906 e foi em 1944 que Sabin e Schlesinger isolaram pela primeira vez o vírus (MONATH & HEINZ,1996).

Com a co-circulação de múltiplos sorotipos do DENV, surgiram os primeiros casos da forma mais grave da doença, a febre hemorrágica do dengue, sendo
15 os primeiros registrados em 1953 e 1954 na Malásia e Filipinas. Entre 1950 e 1960, na América do Sul e Central foram registrado poucos casos de dengue, após a erradicação do vetor *Aedes aegypti*. Em 1970 o vetor foi reintroduzido nesses locais, após falhas no programa de erradicação (FIGURA 1). Em meados de 1980, países da América, após longos tempos sem registros de
20 casos de dengue, apresentaram as maiores epidemias após a introdução de novas amostras e sorotipos como DENV-1 (1977); uma nova amostra de DENV-2 (1981); DENV-4 (1981) e uma nova amostra de DENV-3 (1994) (GUBLER, 1998).

5

10



15

FIGURA 1: Reinfestação das Américas com o vetor *Aedes aegypti*. A reintrodução do vetor em países que tinham erradicado o *Aedes aegypti*. A evolução do mapa de 1970 a 2006 mostra que o vetor conseguiu restabelecer em praticamente quase toda a América do Sul e parte da América Central. Fonte: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue>.

20

No Brasil, a dengue foi reintroduzida em 1986, após pelo menos vinte anos sem registros de casos, exceto em 1981 em Roraima e alguns casos esporádicos. Desde então, o Brasil se tornou o país que registra o maior número de casos na Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo o responsável por mais de 70% dos casos registrados nas Américas. O DENV-1 foi reintroduzido, no Rio de Janeiro, em 1986, o DENV-2 em 1990 e o

25

DENV-3 em 2002, no Rio de Janeiro. Em 2007 foi registrado um aumento de casos de febre hemorrágica (RODRIGUEZ-BARRAQUER, *et al.*, 2011).

30

Em Belo Horizonte, no ano de 1996, a primeira epidemia de dengue na cidade, acometeu mais a região de Venda Nova e a regional Oeste em 1997. Em ambas as epidemias, foram registradas apenas a circulação do DENV-1. Em 1998, houve a circulação do DENV-1 e DENV-2, tendo cerca de 86.000 casos e sendo considerada a epidemia de maior magnitude na cidade. Em 2002, foi registrada a circulação do DENV-3 (PEÇANHA, *et al.*, 2010).

1.2 Família *Flaviviridae*

1.2.1 Classificação

O *Dengue virus* pertence à ordem *Nidovirales*, família *Flaviviridae*. O nome da família *Flaviviridae* (do latim *flavus*, que significa amarelo) foi estabelecido por WESTAWAY (1987), após a descoberta de que esses vírus diferem da família *Togaviridae* na sua composição e no mecanismo de replicação (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2006).

10

A família *Flaviviridae* é composta pelos vírus dos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus* (Vírus da diarreia bovina-BVDV) e *Hepacivirus* (Vírus da hepatite C-HCV), que apresentam semelhanças na morfologia viral, na organização do genoma e nas estratégias de replicação, porém exibem propriedades biológicas distintas e não apresentam uma reação sorológica cruzada (GUBLER, *et al.*, 2007).

15

O gênero *Flavivirus* é composto por 53 espécies virais, sendo que 27 destes são transmitidos por mosquitos, 12 por carrapatos e os 14 restantes são agentes zoonóticos nos quais os vetores são desconhecidos (GUBLER, *et al.*, 2007). Os vírus deste gênero apresentam reatividade cruzada entre si e homologias na sequência genômica (WEAVER & VASILAKIS, 2009). Os vírus transmitidos por mosquitos vetores são divididos em dois grupos principais, de acordo com a ecologia do vírus e com os sintomas clínicos causados em humanos. As encefalites são causadas por vírus que estão no sorogrupo da Encefalite Japonesa e inclui o *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV), *Murray Valley encephalitis virus* (MVEV) e *St. Louis encephalitis virus* (SLEV). O outro grupo inclui o Vírus da Febre Amarela (YFV) e o *Dengue virus* (DENV), causadores de febre hemorrágica (ICTV, 2006).

20

25

30

O DENV contém 4 sorotipos (DENV-1; DENV-2; DENV-3; DENV-4), que apresentam diferenças antigênicas e genômicas entre si. Análises das

sequências dos ácidos nucleicos, dos sorotipos, confirmaram a existência de homologias, bem como a existência de regiões conservadas entre eles. Isto permitiu a classificação do DENV em grupos ou genótipos com pequenas diferenças genéticas, que equivale a 6% do genoma (revisado por WEAVER & VASILAKIS, 2009).

1.2.2 Morfologia

As partículas do DENV apresentam morfologia esférica, com um capsídeo/nucleocapsídeo envolto por um envelope com dimensões variando entre 40-60nm de diâmetro. O material genético é uma fita de RNA de polaridade positiva envolto por um capsídeo, de simetria poliédrica e que envolve o núcleo com dimensões de 25-30nm de diâmetro. A superfície é envolta por uma bicamada lipídica circundada por espículas constituídas de glicoproteínas (FIGURA 2) (MUKHOPADHYAY, *et al.*, 2005; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2006)

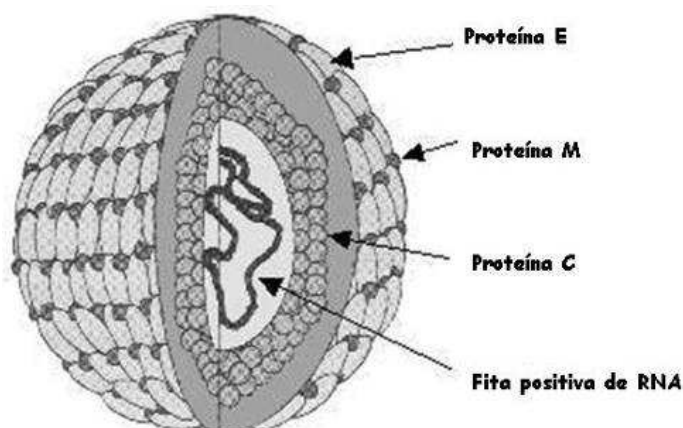


FIGURA 2: Morfologia e estrutura do DENV. A partícula do DENV é composta por um nucleocapsídeo icosaédrico e um envelope. É constituído por RNA de polaridade positiva, fita simples e três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais. Fonte: **SANCHEZ, 2005.**

1.2.3 Estrutura do genoma

O genoma do DENV é constituído por uma molécula de RNA com polaridade positiva, com aproximadamente 10,8Kb e uma região aberta de leitura (ORF) que codifica apenas uma poliproteína, com regiões não codificadoras (UTRs) na extremidade 3' (entre 400 a 700 nucleotídeos) e 5' (100 nucleotídeos) (MUKHOPADHYAY, *et al.*, 2005). O genoma do DENV é considerado um material infeccioso, por funcionar como RNA mensageiro (RNAm). Entretanto a presença de um resíduo “cap” metilado na extremidade 5' e a ausência de uma cauda poli-A na extremidade 3', o diferenciam do RNAm propriamente dito (LINDENBACH, *et al.*, 2007).

A região amino-terminal do genoma codifica três proteínas estruturais que constituem a partícula viral: a proteína do capsídeo (C), a proteína de membrana (M, cujo precursor é a prM) e a proteína do envelope (E). Sete proteínas não estruturais, essenciais à replicação do genoma, também são codificadas (MUKHOPADHYAY, *et al.*, 2005).

A proteína do capsídeo consiste de 120 aminoácidos (aa) e é responsável pelo empacotamento do genoma e a formação do nucleocapsídeo (NC). A prM (com 165 aa), assim como a proteína E (com 495 aa), é uma glicoproteína, que após a clivagem do peptídeo pr para a liberação da proteína M, mantêm a função de auxiliar na montagem da proteína E. A proteína E apresenta três domínios que auxiliam na alteração conformacional do vírus durante o processo de maturação e fusão (MUKHOPADHYAY, *et al.*, 2005).

As proteínas M e E recobrem o nucleocapsídeo viral e formam a camada mais externa do vírus. A partícula viral sofre uma mudança conformacional durante o ciclo de multiplicação, relacionadas com as informações estruturais do vírus

maduro e imaturo. A estrutura da partícula imatura apresenta 60 espículas triméricas, irregulares e proeminentes na superfície viral, que torna o diâmetro da partícula mais espessa que o vírus maduro, sendo a porção pr da proteína prM a responsável pelo aumento da partícula. A maturação é um processo que envolve dois passos: o primeiro é a alteração morfológica, induzida pelo baixo pH, que envolve as proteínas M e E durante a passagem destas pelas redes do complexo de Golgi (CG). Esta alteração favorece a clivagem da prM pela furina. Durante a maturação, 60 trímeros de prM/E, que se projetam da superfície viral, se dissociam e formam 90 homodímeros de E. O segundo passo é o rearranjo que o vírus sofre após a fusão com a célula hospedeira, seja através do contato com os receptores ou ainda no endossomo antes da formação dos trímeros da proteína E (MUKHOPADHYAY, *et al.*, 2005).

As proteínas não estruturais NS3 e NS5 são as mais caracterizadas e apresentam múltiplas atividades enzimáticas, tendo a NS3 a função de: serino-protease, (formação da poliproteína); atividade de helicase/NTPase (desenrola o RNA para a replicação); RNA trifosfatase (forma o cap no RNA recém produzido). A NS5 é a mais conservada entre os DENV, com uma identidade acima de 75% de homologia e com a função de RdRp (RNA polimerase dependente do RNA). A NS1 está envolvida na replicação do RNA e na síntese do RNA de polaridade negativa. A NS2a está envolvida no processo de montagem da membrana do vírus. A NS4a está relacionada com o processo replicativo enquanto a NS4b inibe a resposta do IFN-I nas células do hospedeiro (SAMPATH, *et al.*, 2008).

25

A 5'UTR serve como um complemento á síntese da fita de RNA de polaridade negativa e, apesar de não ser bem conservada entre os *Flavivirus*, existem estruturas secundárias, comuns entre o gênero, que auxiliam na transcrição do genoma. A 3'UTR apresenta alças (SL), que são comuns entre o gênero e que interagem com o vírus, além de regiões específicas ao vetor. Uma região de 25 nucleotídeos (nt) acima da alça da 3'UTR se conecta a uma região na 5'UTR,

próxima ao gene do capsídeo, durante o processo de replicação do genoma (FIGURA 3) (LINDENBACH, *et al.*, 2007).

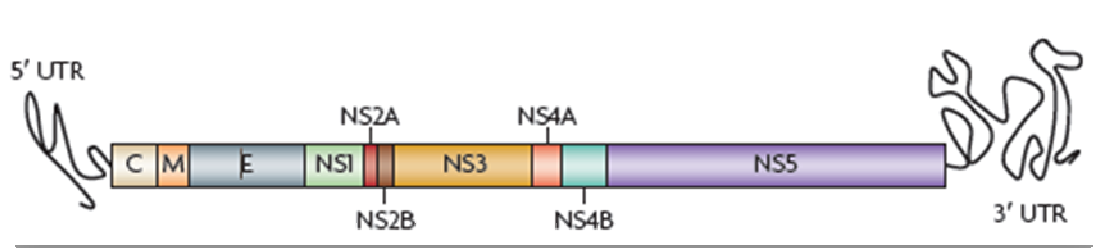


FIGURA 3: Representação esquemática das características do genoma do *Dengue virus*. A poliproteína sintetizada codifica três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais. Além disso, apresenta regiões não codificadoras na região 5´ e 3´ do genoma. Fonte: **GUZMAN, *et al.*, 2010.**

1.2.4 Ciclo de multiplicação do *Dengue virus*

- 10 O sítio primário da multiplicação do DENV, após a picada do mosquito, é em células dendríticas e linfonodos locais. As células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos, monócitos e células B) são os locais alvos secundários de multiplicação viral. A infecção de leucócitos periféricos, fígado, baço, medula óssea, timo, coração, rins, estômago, pulmões e até mesmo o cérebro é
- 15 também possível (SINGHI, *et al.*, 2007).

O DENV penetra na célula hospedeira por endocitose mediada por receptor. O ambiente ácido do endossomo favorece a trimerização irreversível da proteína E, resultando na fusão das membranas viral e celular. Após a fusão, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma, a proteína do capsídeo se dissocia do RNA viral iniciando a replicação viral e a subsequente montagem da partícula. O RNA viral, ao penetrar na célula, é traduzido em uma série de

20

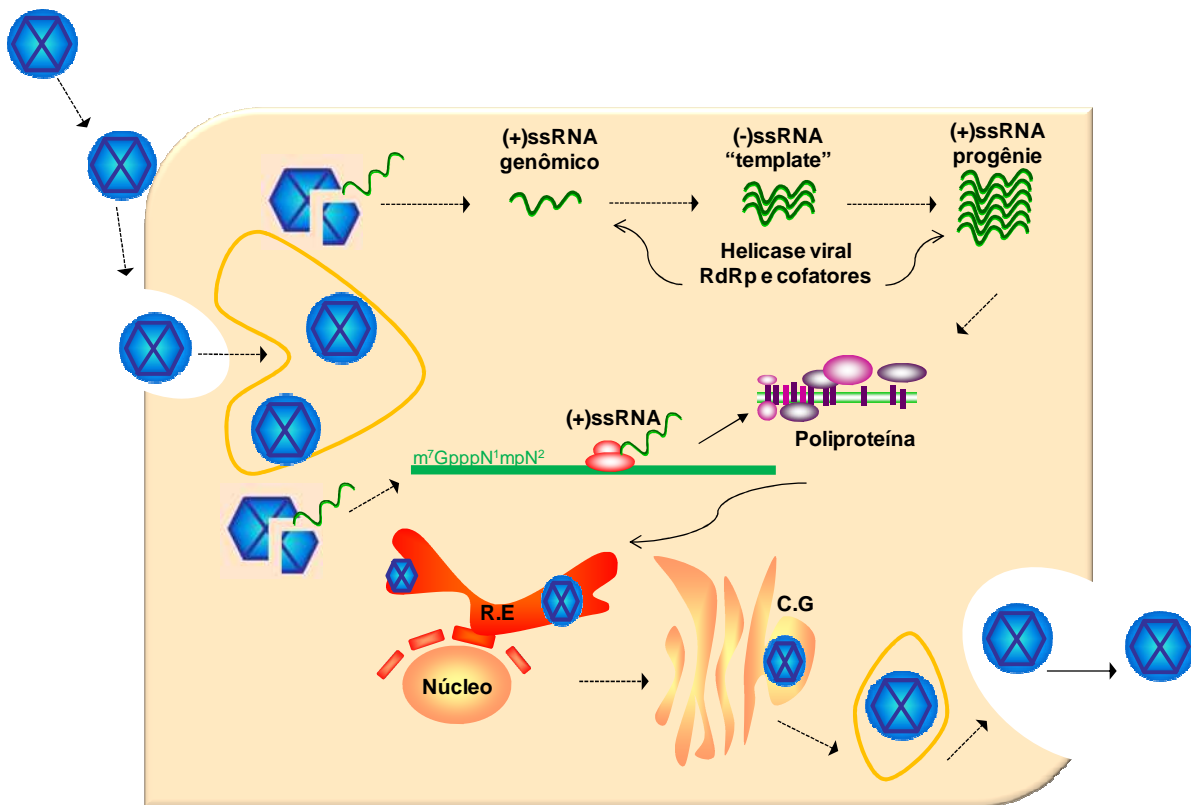
proteína tais como a RdRp, que dentro de poucas horas após a infecção, replica o genoma viral no citoplasma. As alças existentes nas regiões 3' e 5' se interagem, circularizando o genoma viral e facilitando a localização do códon de iniciação AUG pela RdRp (MUKHOPADHYAY, *et al.*, 2005).

5

A tradução da poliproteína se inicia no primeiro códon AUG do genoma e a poliproteína codificada é clivada por proteases específicas no retículo endoplasmático rugoso (RER), individualizando as proteínas estruturais e as não estruturais. O resultado da tradução é uma poliproteína que é clivada em
10 pelo menos dez proteínas. Um quarto da região N-terminal codifica primeiramente as proteínas estruturais (C-prM-E) e em seguida as proteínas não estruturais (NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5). As peptidases de sinais dos hospedeiros são responsáveis pelas clivagens entre as junções das proteínas C/prM, prM/E, E/NS1 e 2K/NS4b. As serino proteases codificadas
15 pelo vírus são responsáveis por clivagens entre as junções NS2a/NS2b, NS2b/NS3, NS3/NS4a, NS4a/2K e NS4b/NS5. A enzima responsável pela clivagem da proteína NS1/NS2a ainda é desconhecida. Durante a tradução da poliproteína, as proteínas estruturais são translocadas e ancoradas na membrana do RE através das várias sequências sinais e domínios que
20 ancoram na membrana. A proteína do capsídeo contém uma sequência sinal hidrofóbica que transloca a prM para o lúmen do R.E (MUKHOPADHYAY, *et al.*, 2005.; LINDENBACH, *et al.*, 2007).

Um dos eventos iniciais na montagem dos vírus do gênero *Flavivirus* é a
25 formação do nucleocapsídeo, o qual consiste de uma cópia do RNA genômico e múltiplas cópias da proteína do capsídeo (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005; LINDENBACH, *et al.*, 2007). Inicialmente partículas imaturas constituídas pelas proteínas E e prM, pela membrana lipídica e pelo nucleocapsídeo, são formadas no lúmen do RE e não são consideradas infecciosas pois não são
30 capazes de fazer a fusão com a célula do hospedeiro e não apresentam a proteína do capsídeo e nem o RNA genômico. Em seguida, ocorre a clivagem

da prM na rede do complexo de Golgi (CG), o que torna a partícula madura e portanto infecciosa. As partículas virais são liberadas da célula através do processo de exocitose (FIGURA 4) (MUKHOPADHAYAY *et al*, 2005).



5 **FIGURA 4: Diagrama do ciclo de multiplicação do DENV.** Fonte: modificado de LEYSSEN *et al.*, 2000.

1.2.5 Patogênese, manifestações clínicas e tratamento.

10

Na pele, o DENV infecta as células dendríticas (DCs) através dos receptores ICAM-3 e integrinas (DC-SIGN) (GUZMAN, *et al.*, 2010). A primeira linha de defesa contra DENV são os interferons (IFNs) que, são produzidos tanto pelas DCs quanto pela maioria das outras células infectadas pelo vírus. Os IFNs induzem um estado anti-viral e um controle metabólico para limitar a infecção viral, tanto nas células infectadas quanto nas células vizinhas além de ativar o

15

sistema imune adaptativo SMIT, *et al.*, 2010. As DCs infectadas vão de encontro aos linfonodos e apresentam os antígenos a células T, iniciando a resposta imune celular e humoral (GUZMAN, *et al.*, 2010. Dentro de 6 dias após a infecção, são produzidos os anticorpos contra as proteínas E e prM presentes na superfície do vírus e contra a NS1 quando secretada da célula infectada. Os anticorpos podem neutralizar a infecção viral como contribuir com a progressão da infecção. Para que haja uma neutralização eficiente é necessário que o anticorpo seja específico ao vírus e direcionado ao domínio III da proteína E (SMIT, *et al.*, 2010)

10

Existe uma relação entre casos da forma grave da doença com infecções secundárias (WHITEHEAD, *et al.*, 2007). Infecções subsequentes de indivíduos pré-ímmunes com sorotipo diferente, podem exacerbar o percurso da doença através de um fenómeno causado por anticorpos e conhecido como imunoamplificação dependente de anticorpos (ADE). O ADE pode resultar na infecção de um grande número de células e, conseqüentemente no aumento da carga viral (MARTINA, *et al.*, 2009). O ADE ocorre quando macrófagos e monócitos são infectados, através de seus receptores Fcs, pelos complexos imunes que formam contra o DENV e pelos anticorpos não neutralizantes. Estes anticorpos são resultados de uma infecção causada por outro sorotipo ou de origem materna, quando se trata de crianças (GUZMAN, *et al.*, 2010. A facilidade de penetração do vírus nas células contribui com a intensidade da resposta imune e a liberação de aminas vasoativas, o que pode resultar na forma mais grave da doença (HASTEALD, 1988). Contudo o mecanismo molecular que explica o fenómeno do ADE ainda é desconhecido (SMIT, *et al.*, 2010).

A forma mais branda do DENV denominada de febre do dengue (FD) apresenta um período febril que pode progredir de 1 a 2 dias. Durante o período febril, acompanhado dos sintomas de dor de cabeça, mialgia, artralgia, dores abdominais e náuseas, não tem como prever se o paciente irá progredir

para a forma mais grave da doença (WHITEHEAD, *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2007). Porém após o período febril, sintomas como sangramentos, queda das plaquetas, dores abdominais, vômito e queda da temperatura corporal, são indícios de extravasamento do plasma e início do choque, característica da forma mais grave da doença conhecida como febre hemorrágica do dengue (FHD) e síndrome do choque do dengue (SCD) (FIGURA 5) (GUZMAN, *et al.*, 2010).

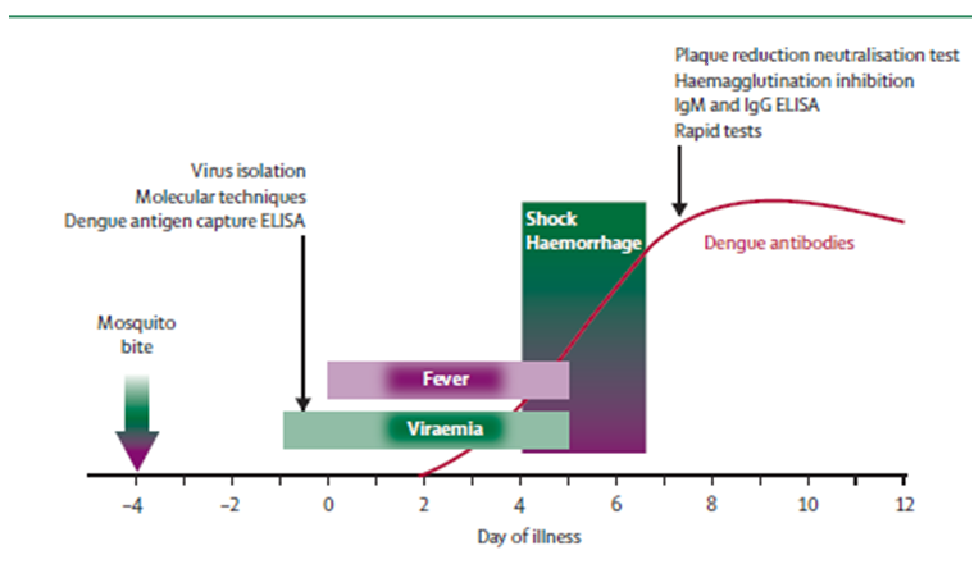


FIGURA 5: Desenvolvimento da infecção por DENV. Cronologia da doença, mostrando o tempo possível de aparecimento dos sintomas, a ativação do sistema imune e os dias possíveis de realizar o diagnóstico correto. Fonte: HASLTEAD, 2007.

Embora DENV varie quanto à viremia produzida nos pacientes, os altos títulos virais (aproximadamente 10^5 - 10^6 por ml) ocorrem durante o período febril nos casos de febre do dengue. Em casos de SCD e a FHD a viremia é geralmente de 10 a 100 vezes maior. Algumas amostras de DENV por causarem uma viremia mais alta, são consideradas mais virulentas e, portanto, contribuem para a formação da forma mais grave da doença (SINGHI, *et al.*, 2007). Alguns estudos que compararam as sequências de DENV isolados de pacientes que apresentaram a doença grave (FHD/SCD) com aqueles isolados de casos de

FD revelaram a existência de variação genética entre as amostras, porém essa diferença não foi consistente o suficiente para aferir que seja a causa da manifestação grave da dengue (revisado por WEAVER *et al.*, 2009).

- 5 Atualmente, não existem agentes terapêuticos específicos para a FD. A infecção é tratada com repouso, hidratação oral, analgésicos e antipiréticos. Medicamentos à base de ácido acetil salicílico (AAS) não devem ser administrados, a fim de evitar hemorragias. Já em quadros de FHD, os
- 10 pacientes devem ser observados cuidadosamente para identificação dos primeiros sinais de choque. Em casos menos graves, quando os vômitos ameaçarem causar desidratação ou acidose, ou houver sinais de hemoconcentração, a reidratação pode ser feita em nível ambulatorial (revisado por MAIRUHU *et al.*, 2004).

15 **1.2.6 Ciclo de transmissão**

- DENV, diferente de outras arboviroses, possui um único ciclo de transmissão do mosquito vetor *Aedes sp* para o humano, sem a necessidade de um hospedeiro mamífero intermediário (WHITEHEAD, *et al.*, 2007). Contudo, em
- 20 países da África e da Ásia é possível que exista, além deste ciclo, um ciclo silvestre, envolvendo primatas como reservatórios natural. Investigações epidemiológicas indicam que esses hospedeiros naturais não apresentam nenhum sinal clínico da doença (FIGURA 6) (DE THOISY *et al.*, 2009).

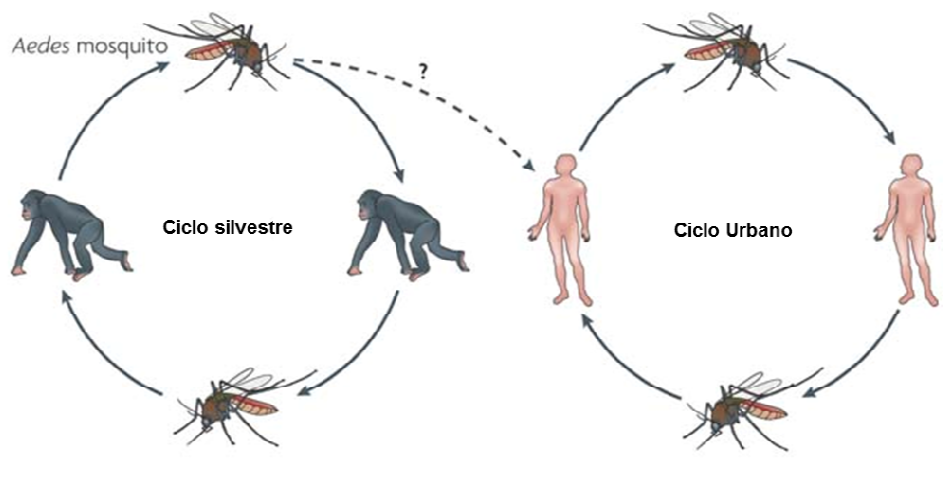


FIGURA 6: Ciclo de transmissão do DENV. O ciclo de transmissão urbano (endêmico) do DENV, envolve o mosquito vetor (*Aedes* sp) e o homem. Contudo, relatos indicam a existência de um ciclo silvestre, em que, além do mosquito vetor e do homem, existe o primata como reservatório natural. Fonte: WHITEHEAD, 2007.

Os ciclos silvestres, ocorrem entre primatas não humanos e outras espécies de *Aedes* sp, que circulam em florestas situadas no oeste da África e na Malásia. Estudos realizados com as amostras de DENV, circulantes nessas regiões, indicam que há diferenças genótípicas entre essas amostras com as circulantes no ciclo endêmico. Contudo, essas amostras apresentam a capacidade de causar infecções em humanos (WEAVER, *et al.*, 2009). Na Guiana Francesa foram detectados anticorpos neutralizantes para DENV-2 em roedores, marsupiais, ungulatos e xenartras, o que indica que os ciclos silvestres de DENV não podem ser excluídos (DE THOISY, 2009).

1.3 Infecção do DENV no vetor

O DENV é transmitido através de mosquitos hematófagos que adquirem o vírus no momento em que se alimentam do sangue contaminado do hospedeiro vertebrado. O limiar de viremia em humanos capaz de infectar o mosquito é de aproximadamente 10^8 DIM/ml (dose infectante para o mosquito) (HALSTEAD, 2008). Após a ingestão, o vírus infecta o mesentério do artrópode, segue pela hemocele, infecta outros tecidos e, por último, alcança as glândulas salivares. Em seguida, o artrópode é capaz de transmitir o vírus para outro hospedeiro vertebrado, através da saliva contaminada, no momento em que se alimenta novamente (FIGURA 7).

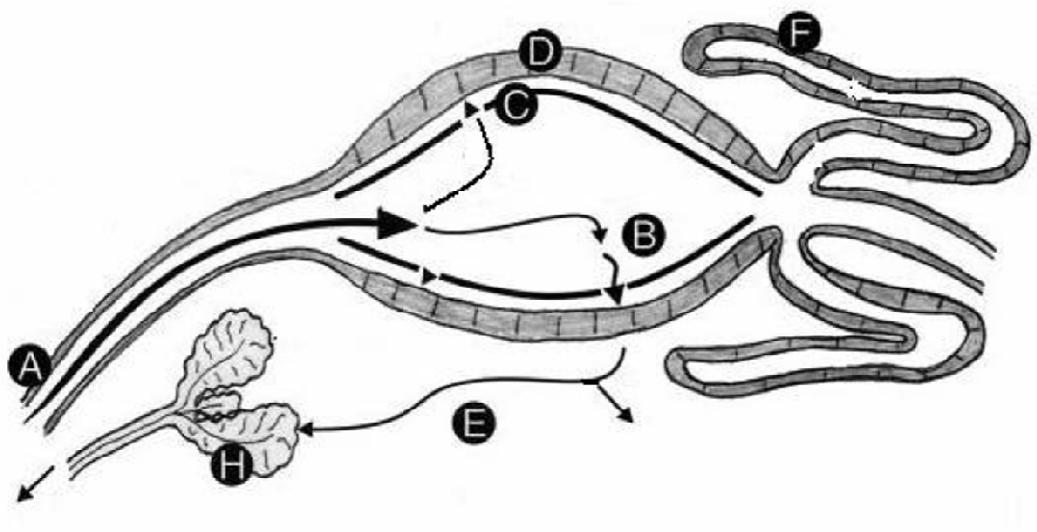


FIGURA 7: Percurso da infecção do DENV no mosquito vetor. As letras indicam os locais de desenvolvimento viral e as setas indicam o caminho percorrido pelo patógeno dentro do inseto. Após a ingestão de sangue infectado (A) os vírus entram nas células epiteliais do intestino médio (D), se replicam e deixam estas células alcançando a hemolinfa (E) e posteriormente, podem infectar e se replicar em outros órgãos do inseto como, por exemplo, as glândulas salivares (H), onde, durante um novo repasto sanguíneo, podem infectar um hospedeiro susceptível. Neste desenho as letras (C) indicam a

matriz peritrófica e (F) os túbulos de Malpighi. Fonte: modificado de **BEERNTSEN et al., 2000**.

O tempo em que o artrópode adquire o vírus de um hospedeiro vertebrado até o momento em que ele alcança as glândulas salivares é conhecido como período de incubação extrínscico (PIE) e a sua duração pode variar com o título viral. Já o tempo em que o vírus é capaz de ocasionar uma viremia no hospedeiro vertebrado é conhecido como período de incubação intrínscico (FIGURA 8) (GUBLER, et al., 2007) .

10

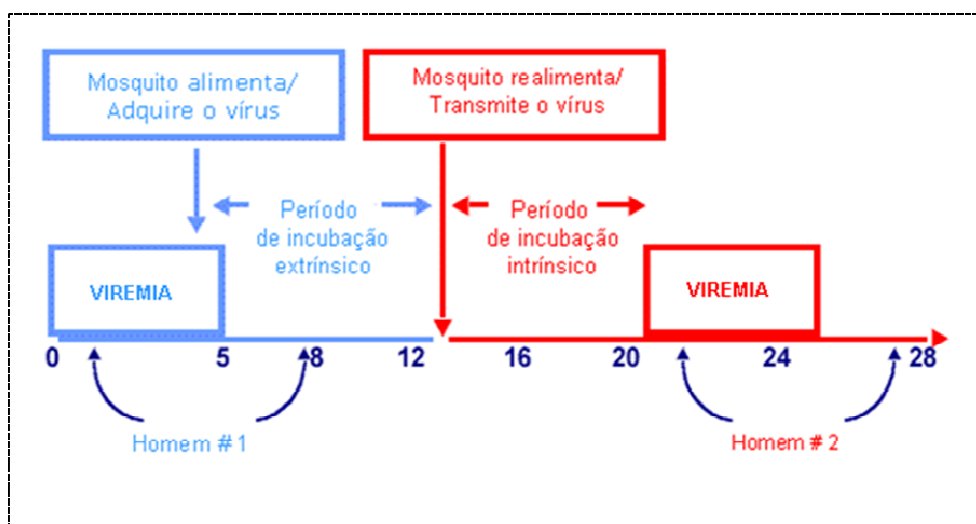


FIGURA 8: Modelo de infecção do mosquito pelo DENV. O período de incubação extrínscico é o tempo que o vírus infecta o mosquito, multiplica e alcança as glândulas salivares. O período de incubação intrínscico é o tempo que o vírus é capaz de ocasionar uma viremia no hospedeiro vertebrado. Fonte:

15 adaptado de **GUBLER, et al., 2007**

O PIE dura de 8 a 14 dias e é dependente da amostra viral circulante, da temperatura ambiente e do mosquito vetor. Existem relatos de DENV nas glândulas salivares até 4 dias após o repasto sanguíneo (revisado por

FREITAS, 2010). O tamanho do inóculo, o título viral e a quantidade de sangue durante a alimentação do inseto, podem influenciar na disseminação do vírus pelas glândulas salivares do artrópode e a probabilidade de transmissão do vírus varia com a frequência de picadas do mosquito vetor. Contudo, esta característica está relacionada com o período de desenvolvimento gonotrófico, que é o tempo que antecipa a oviposição do mosquito (revisado por HALSTEAD, 2008; GUBLER *et al.*, 2007; GIBBONS & VANGHN, 2002).

Outra forma de transmissão do vírus para o mosquito vetor pode ser da fêmea para o macho e da fêmea para a progênie. O macho, por não ser hematófago, pode ser infectado através da cópula ou transovariamente (MELLOR, 2000). A transmissão transovariana ou vertical ocorre quando o ovariolo da fêmea torna-se infectado e o vírus então, infecta os ovos. Quando os folículos ovarianos em desenvolvimento se tornam infectados, o vírus se replica e persiste no inseto durante a embriogênese, desenvolvimento larval e na metamorfose para o estágio adulto desta geração (WOODRING *et al.*, 1996).

A transmissão vertical é uma hipótese para justificar a manutenção dos arbovírus na natureza, pois o vírus pode ficar protegido na fase de ovo do ciclo de vida do inseto, resistindo assim às condições adversas como as estações secas e os períodos em que o número de mosquito é insuficiente para manter a circulação do DENV (GUBLER, *et al.*, 2007; THENMOZHI *et al.*, 2007; MONATH & TSAI, 1997).

O órgão alvo para a multiplicação viral, de embriões do mosquito vetor, em casos de transmissão vertical, pode ser considerado um importante fator na longevidade e sobrevivência daquele hospedeiro (JOSHI, *et al.*, 2002).

Cerca de 20% de gerações sucessivas de mosquito, fiquem infectadas pelo DENV, através da transmissão vertical (JOSHI *et al.*, 2002).A transmissão

vertical representa um mecanismo de manutenção do vírus durante os períodos inter- endêmicos (GUBLER, et al., 2007). Em 2003 foram encontradas, na região da Pampulha, em Belo Horizonte, quatro amostras de larvas naturalmente infectadas por DENV, sendo que três são da espécie *Aedes albopictus* e uma de *Aedes aegypti* (EVANGELISTA, 2003). Também VILELA e colaboradores em 2010, detectaram DENV-3 em larvas eclodidas de ovos coletados no campo. Outros estudos indicam que a taxa de transmissão vertical é maior em *A.albopictus* do que em *A.aegypti* (ROSEN, et al., 1983).

10 1.3.1 Biologia do Vetor

O mosquito vetor do DENV pertence à ordem *Díptera*, família *Culicidae*, ao gênero *Aedes*, sendo as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* as mais importantes (CONSOLI & LOURENÇO-OLIVEIRA, 1994). Os mosquitos se desenvolvem através de metamorfose completa, e o ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários), pupa e adulto. Os ovos são de contorno alongado e fusiforme com cor branca, logo após a postura, mas adquirem coloração negra brilhante em seguida. A fecundação ocorre durante a postura dos ovos e, em condições de umidade e temperatura adequadas, o desenvolvimento do embrião se completa em 48 horas. Porém, os ovos são capazes de tolerar condições adversas por até um ano. O *Aedes sp*, por ser holometábolo, apresenta a fase larval como o período de alimentação e crescimento. As larvas possuem quatro estágios evolutivos e a durabilidade de cada uma está relacionada com a temperatura, densidade e disponibilidade de alimento. Em condições ideais, esse período chega a 5 dias. A larva é dividida em cabeça, tórax e abdômen. O abdômen é dividido em oito segmentos. O segmento posterior e anal do abdômen tem quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão ou tubo de ar para a respiração na superfície da água. O sifão é curto, grosso e mais escuro que o corpo. Para respirar, a larva vai até a superfície, onde fica em posição quase vertical. As pupas não se

alimentam. É nesta fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto, que dura de dois a três dias (FIGURA 9) (FUNASA, 2001).

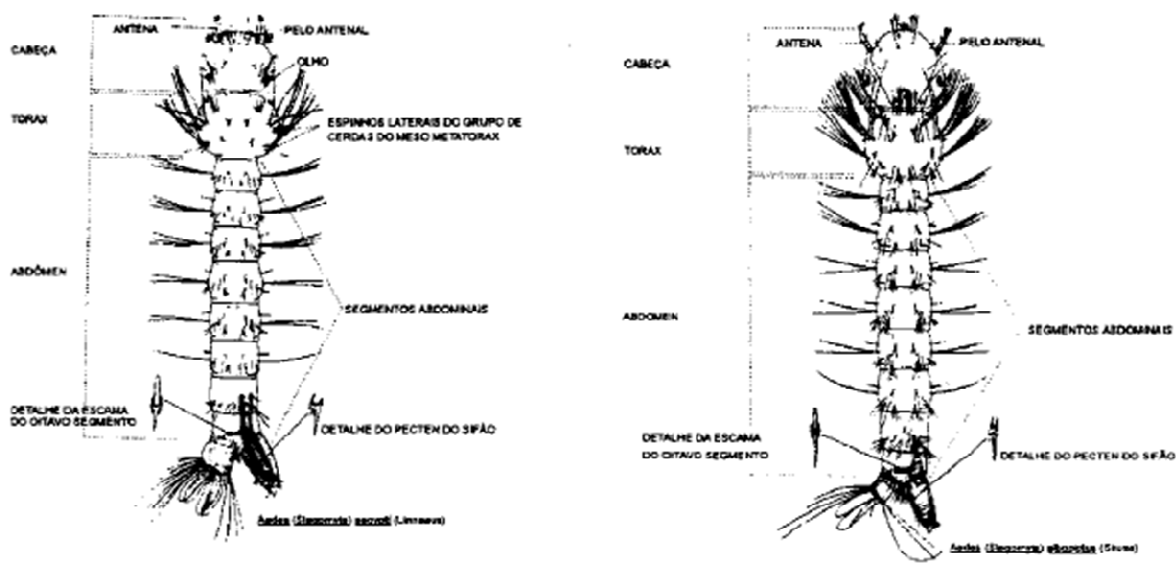


FIGURA 9: Principais diferenças morfológicas das larvas de *A.aegypti* e

5 ***A.albopictus***. A larva é dividida em cabeça, tórax e abdômen, sendo este dividido em oito segmentos. A morfologia do VIII segmento é distinta entre as larvas das duas espécies. O sifão respiratório é outra característica importante que distingue o *A.aegypti* em *A.albopictus*. Fonte: **FUNASA, 2001**.

10 A capacidade de transmitir o vírus depende de fatores intrínsecos e extrínsecos. A variabilidade genética é um fator intrínseco de grande importância tanto para o vírus quanto para o vetor. A susceptibilidade oral para infecções em mosquitos pode ser aumentada ou diminuída através da seleção genética, por exemplo. A competência do vetor está relacionada à capacidade intrínseca do

15 artrópode tornar-se infectado oralmente e de suportar a multiplicação viral, favorecer a disseminação e realizar a transmissão viral (GUBLER, *et al.*, 2007; RICHARDSON *et al*, 2006).

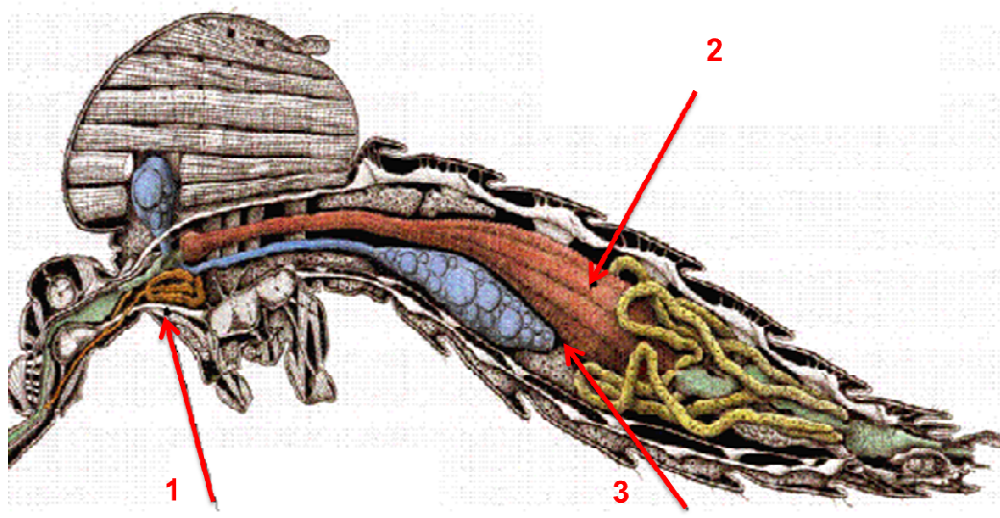
A capacidade vetorial representa a habilidade do mosquito em transmitir o agente infeccioso. No caso de *A.aegypti* esta capacidade está relacionada com a taxa de sobrevivência diária e o PIE (FREITAS, *et al.*, 2010). Fatores ambientais, comportamentais, celulares e bioquímicos, que influenciam a associação entre vetores, os patógenos e o hospedeiro vertebrado, são considerações importantes para a capacidade vetorial (BEERNTSEN *et al.* 2000).

Os mosquitos têm o seu metabolismo influenciado pelos fatores ambientais. A temperatura afeta diretamente a multiplicação do vírus e influencia a taxa do PIE. As altas temperaturas podem favorecer a transmissão do vírus, porém contribuem o aumento da taxa de mortalidade dos mosquitos e diretamente à diminuição da transmissão viral. A umidade e as chuvas afetam o comportamento e a biologia do vetor, como vôo e a oviposição, e influenciam nas taxas de mortalidade do mosquito (GUBLER, *et al.*, 2007).

O tamanho e a biologia da população do mosquito vetor são importantes para uma transmissão eficiente do DENV. A densidade, número de reprodução básica (quantidade de infecções secundárias resultantes de um único hospedeiro infectado), heterogeneidade da população vetor, efeito causado pela temperatura e chuva, são fatores importantes que contribuem com a infecção do mosquito (revisado por HALSTEAD, 2008).

O fato de ser susceptível ou não a infecção por DENV é definido como permissividade intrínica do mosquito vetor à infecção, replicação e transmissão. Essa competência vetorial está relacionada com a capacidade de transmitir o vírus (BEERNTSEN *et al.* 2000). O vírus, quando ingerido pelo mosquito, encontra várias barreiras à infecção. A primeira delas, e talvez a mais eficiente, são as barreiras físicas e químicas, no intestino, composta por células

intestinais e enzimas digestivas (FREITAS, *et al.*, 2010). Outras barreiras estão presentes nas glândulas salivares, em que há pouca quantidade de carga viral, e barreiras de infecção no ovário, que afeta diretamente a transmissão vertical. Neste caso o vírus tem que escapar do mesentério, cair na hemocele e atravessar as barreiras do ovário, ovariolo até infectar o epitélio folicular, para finalmente atingir os oocitos em desenvolvimento. Os vírus alcançam o epitélio folicular já no segundo ou terceiro ciclo ovariano, pois a ovogênese inicia logo após o repasto sanguíneo do mosquito (FIGURA 10) (MELLOR, 2000).



10 **FIGURA 10: Barreiras naturais de infecção pelo DENV.** A competência vetorial está associada com várias barreiras anatômicas que existem no inseto. Essas barreiras podem ser classificadas como: 1- barreira da glândula salivar; 2- barreira de escape do intestino médio para alcançar as células epiteliais; 3- barreira de escape do intestino médio para alcançar outros tecidos. Fonte: 15 modificado de **JOBLING *et al.*, 1987.**

Outra barreira física, encontrada no mesentério do vetor, é a camada periotrófica. Durante a digestão do sangue ingerido, as células presentes no mesentério, secretam N-acetilglicosamina e galactose, que são os principais constituintes da camada. Em *A.aegypti*, o processo de formação da camada periotrófica inicia cerca de 8 horas após o repasto sanguíneo e, dentro de 12 20

horas, ela já está completamente formada. A sua principal função é proteger o epitélio do mesentério da possível ação de patógenos, além de atuar como um filtro semipermeável as proteínas e enzimas digestivas do sangue, e como barreira de retenção para as proteases inibitórias do lúmen. O processo de formação inicial é após a ativação da enzima glutamino sintetase, que sintetiza a glutamina, que está envolvida na biossíntese da glicosamina-6-fosfato, que é convertida em N-acetil-glicosamina, usada também na síntese da quitina (SMARTT, *et al.*, 1998).

10

O tempo de vida média do mosquito vetor é de aproximadamente 8.6 dias. A população de mosquito declina com o decorrer da idade e, embora a maioria das fêmeas morra ainda em idade precoce, existem casos de transmissão de DENV por mosquito com um tempo de vida avançado. Isto pode ocorrer caso a fêmea adquira o vírus na sua primeira alimentação, ou seja, no seu primeiro dia de vida (revisado por HALSTEAD, 2008). Estudos feitos com marcadores de *A.aegypti*, revelaram que já foram coletados mosquitos até 43 dias após a marcação (FREITAS, *et al.*, 2010).

20 1.3.1.1 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti desenvolveu-se na África, aonde o vetor *Aedes aegypti formosus* de mesmo ancestral, era endêmico. A sua domesticação foi facilitada com o transporte de escravos da África para as Américas. É um vetor que tem sofrido grande expansão mundial e é considerado o principal transmissor do DENV e do *Yellow fever virus* (revisado por HALSTEAD, 2007; PAUPY *et al.*, 2009).

A larva e a pupa do mosquito preferem água limpa depositadas em recipientes artificiais. Os ovos ficam aderidos nas paredes dos recipientes e isto facilita a

30

resistência dos mesmos à dessecação durante meses. A sua eclosão ocorre somente quando o mesmo submerge na água (revisado por HALSTEAD, 2008).

- 5 A fêmea do *A.aegypti* apresenta uma característica antropofílica e certa tendência a alimentações ininterruptas e múltiplas, em um mesmo hospedeiro ou em hospedeiros diferentes, fato que contribui com o ciclo gonotrófico completo. Essa característica favorece a potencialidade de infecção do mosquito vetor (revisado por HALSTEAD, 2008).

10

1.3.1.2 *Aedes albopictus*

- Aedes albopictus* é originário das florestas do sudeste asiático, e o seu hábito era considerado zoofílico. É uma espécie invasiva e pode ser encontrada na
- 15 Ásia, Europa, América do Sul e do Norte e África. Sua expansão geográfica ocorreu nas últimas três décadas e é considerado o terceiro mosquito vetor cuja expansão foi favorecida por atividades humanas (PAUPY *et al*, 2009).

- As fontes sanguíneas alternativas (animais domésticos e o homem) e água,
- 20 para desenvolvimento larval, favoreceram a adaptação progressiva às mudanças ambientais, o que lhe confere uma plasticidade ecológica bastante forte. A primeira detecção do mosquito no Brasil aconteceu no ano de 1986, se espalhando posteriormente para outros 17 estados brasileiros. Mais de vinte anos após a sua introdução no Brasil, foi sugerido que houve um declínio da
- 25 população de *A. aegypti* e, estudos afirmam que há certa superioridade quando ocorre uma competição com o *A.albopictus*. A redução da população residente de mosquitos é devido à competição interespecífica, das larvas principalmente por comida (FERNANDEZ & FORANTINI, 2003; PAUPY *et al*, 2009).

O *A. albopictus* é considerado o vetor secundário em áreas em que ambas as espécies co-existem. Contudo, em locais em que este vetor existe sozinho ou é dominante, fica demonstrado seu potencial papel em conduzir grandes surtos de DENV. Além disso, este vetor de áreas rurais e suburbanas é capaz de transmitir 26 viroses pertencentes às famílias: *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Bunyaviridae* (gênero *Bunyavirus* e *Phlebovirus*), *Reoviridae* (gênero *Orbivirus*) e *Nodaviridae* (gênero *Picornavirus*).

10

1.4 Epidemiologia, controle e prevenção da doença

A incidência, distribuição e as manifestações clínicas graves da dengue aumentaram muito nas últimas décadas. O crescimento populacional nos trópicos criou uma urbanização descontrolada e com ela, o surgimento de um maior número de casos de infecções por DENV. O uso inadequado da água contribuiu com o surgimento de locais que servem de criadouros das larvas do vetor (GIBBON & VAUGHN, 2002).

A alta densidade de pessoas circulando de uma região a outra, favorece com a rápida expansão de novos sorotipos para outros Estados e até mesmo para outros países. Isso possivelmente resulta em grandes epidemias, principalmente devido à alta susceptibilidade da população e dificuldades de controle do mosquito (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2002).

25

Mais de 2,5 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para a infecção com dengue e 250.000 a 500.000 casos de FHD ocorrem anualmente, sendo que 5% destes são fatais. Em março de 2008, as autoridades de saúde do Brasil

registraram um total de 120.570 casos de dengue, sendo que 647 foram de FHD e 48 casos foram ao óbito (GUBLER, *et al.*, 2007; WHO, 2009).

5 A rápida expansão do DENV-3 na América Central pode ter pelo aumento populacional do vetor da década de 1970 e também pelo fato da maioria das pessoas, dessa região, não apresentar anticorpos neutralizantes para DENV-3 (KOBAYASHI *et al.*, 1999).

10 A reintrodução do vetor *A. aegypti*, em países de clima tropical como o Brasil, favoreceu a expansão da doença por todo o território brasileiro. A introdução do DENV-1 ocorreu em meados da década de 1980, seguida da introdução do DENV-2 em meados de 1990. A partir dessa época a dengue aumentou em países da América Central e do Sul, sendo registrados mais de três milhões de casos de febre do dengue (FD) de 2000 a 2005. Em 1998, época em que a doença sofreu uma grande expansão mundial houve uma estimativa de 345.7
15 casos a cada 100.000 habitantes. Após a introdução de DENV-3, em 2002, houve um aumento nos casos de FD e febre hemorrágica do dengue (FHD) (0.34% de todos os casos de dengue relatados) (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

20 Desde 1996, sucessivas epidemias têm ocorrido em Belo Horizonte. Dos 700.000 casos de DENV registrados na América Latina em 1998, 12,4% deles ocorreram em Belo Horizonte e 58,8% foram registrados no estado de Minas Gerais (FIGUEIREDO, *et al.*, 2008). No ano de 2002, foram notificados 10.940 casos suspeitos de dengue em Belo Horizonte, sendo 4.030 confirmados, com ocorrência de 53 casos de FHD. Em 2003, ocorreram 3.756 notificações, sendo
25 1.548 confirmados, com 53 casos de FHD (FIGUEIREDO, 2006).

No ano de 2010, após a 9ª semana epidemiológica, Minas Gerais apresentou 48.723 casos notificados de dengue, com incidência de 243,2 casos por 100 mil habitantes. Durante este enfoque epidemiológico, dos 35,4% dos casos

notificados no país, 4% correspondeu a cidade de Belo Horizonte-MG (SECRETARIA NACIONAL DE SAÚDE).

O novo mapa da doença foi traçado com base no Risco Dengue, ferramenta
 5 lançada pelo Ministério da Saúde em setembro de 2010 que leva em
 consideração seis critérios básicos, dos quais quatro são do setor Saúde –
 Incidência atual de casos; incidência de casos nos anos anteriores, índices de
 infestação pelo *Aedes aegypti* e sorotipos em circulação. O quinto critério é
 10 ambiental: cobertura de abastecimento de água e coleta de lixo; e o último é
 demográfico, relacionado a densidade populacional (FIGURA 11)
 (SECRETARIA NACIONAL DE SAÚDE).

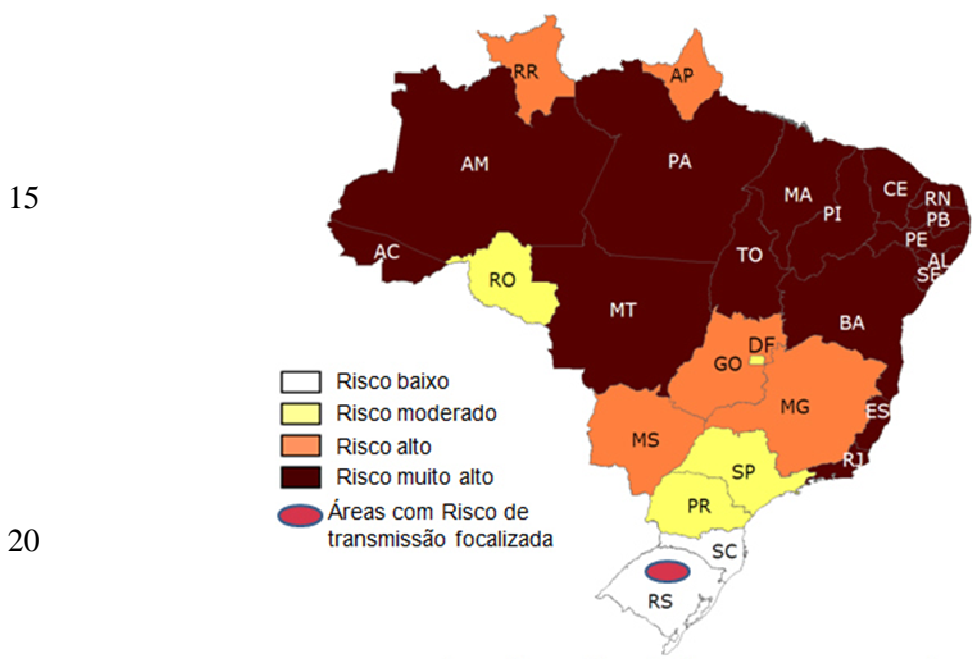


FIGURA 11: Mapa de risco mostrando a situação de risco da dengue em
 25 **2011.** No novo mapa da dengue no país, Acre, Amazonas, Pará, Maranhão,
 Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe,
 Bahia, Tocantins, Mato Grosso, Espírito Santo e Rio de Janeiro são os estados
 com alto risco de enfrentar epidemia neste começo de ano. Roraima, Amapá,
 Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul estão com risco alto para a dengue
 30 e também precisam reforçar as ações de prevenção e combate à doença. O

mapa não mostra a dispersão de DENV-4 entre os estados. O estado de SC não tem registro de transmissão autóctone de DENV. Fonte: **SECRETÁRIA NACIONAL DE SAÚDE-2011.**

5 O Ministério da Saúde e as Secretarias de Saúde do estado de Roraima e do município de Boa Vista intensificaram as buscas de casos suspeitos de dengue, depois que o Instituto Evandro Chagas (IEC) confirmou, no ano de 2010, três casos de dengue tipo 4 na capital, após 28 anos sem casos registrados deste sorotipo. Os três pacientes que tiveram DENV-4 foram
10 infectados em Boa Vista e as idades deles variam entre 15 e 44 anos. Todos tiveram sintomas de dengue clássica e se curaram sem necessidade de internação (SECRETARIA NACIONAL DE SAUDE).

Além das aplicações de inseticidas, a forma mais efetiva no combate ao vetor é
15 a redução dos locais de oviposição do mosquito. No processo de eliminação dos criadouros das larvas, a participação da comunidade é de fundamental importância, uma vez que os reservatórios se localizam, principalmente, no meio doméstico. Nesse sentido, os programas de conscientização e educação se mostram relevantes (revisado por MAIRUHU et al., 2004).

20

A principal estratégia de combate ao vetor é a eliminação dos locais que servem como criadouros às larvas dos mosquitos vetores. De acordo com a Fundação Nacional de Saúde (FNS), várias medidas de infestação podem ser empregadas para avaliar os riscos de transmissão do dengue. Os índices mais
25 utilizados são: 1. predial - relação (%) entre o número de imóveis positivos onde foram encontradas larvas e/ou pupas da espécie do vetor; 2. de recipiente - relação (%) entre o número de recipientes com água positivos e o número de recipientes pesquisados com água; e 3. de Bretau – relação entre o número de recipientes positivos e o número de imóveis pesquisados, corrigido de forma
30 que o resultado obtido diga respeito a 100 imóveis. Todos esses índices são estimativas, baseadas na população larval, e como tais não refletem,

necessariamente, o tamanho da população adulta dos mosquitos transmissores. Por essa razão, a FNS orienta no sentido de que os três índices sejam utilizados paralelamente, de modo a oferecer uma avaliação mais segura dos riscos de transmissão (VILELA, 2007).

5

Poucos programas de controle ao vetor da dengue são realmente eficazes. Além disso, o transporte de pessoas infectadas de um local a outro, pode alterar a característica de uma região antes não endêmica para uma região endêmica, de um único sorotipo circulante, ou até mesmo para um local de hiperendemicidade, aonde há a presença de mais um sorotipo do vírus (GIBBON & VAUGHN, 2002)

10

1.5 Metodologias de estudo para o *Dengue virus*

15

O diagnóstico de infecções por DENV ocorre pela detecção do vírus, dos antígenos virais e/ou RNA em soro ou tecidos, por meio da detecção de anticorpos específicos no soro dos pacientes (GUZMÁN & KOURÍ, 1996).

20

Os métodos de isolamento viral baseiam-se em inoculação intracerebral de camundongos, cultivo em células de mamíferos, inoculação intratorácica de mosquitos adultos e cultivo de células de mosquitos. O cultivo em células de mamíferos apresenta as mesmas desvantagens que a inoculação intracerebral de camundongos, sendo o custo elevado, a demora para o isolamento e a

25

baixa sensibilidade de alguns dos fatores. Embora este método seja muito utilizado em laboratórios, o seu uso não é recomendado para diagnóstico. A inoculação em mosquitos, de ambos os sexos, é o método mais sensível para o isolamento do DENV, pois este se multiplica gerando altos títulos e em pouco tempo. A detecção é feita pela imunofluorescência indireta dos tecidos do

30

mosquito, geralmente cérebro ou glândulas salivares. O cultivo de células mais

usado seria o clone C6/36 obtido de células de *Aedes albopictus*. O uso desta linhagem celular tem contribuído para uma metodologia rápida, sensível e econômica para o isolamento do DENV (GUZMÁN & KOURÍ, 1996).

- 5 Detecção de anticorpos IgG e IgM através do método de ELISA (ensaio imunoenzimático) é um critério muito usado. Porém os métodos sorológicos são incapazes de detectar a infecção viral durante a fase inicial da doença (AYERS, *et al.*, 2006).

10 A técnica de inibição da hemaglutinação (IH) consiste na detecção de anticorpos a partir do quinto ou sexto dia de sintomas e a principal desvantagem é a ausência de especificidade, pois não identifica o sorotipo com precisão. O teste de fixação do complemento (FC) é baseado no princípio de que o complemento será consumido durante reação antígeno-anticorpo. Esses testes são bastante específicos nas infecções primárias, possibilitando a
15 determinação do sorotipo infectante. O teste de neutralização é sorotipo-específica, porém é de elevado custo e o tempo necessário para sua realização é longo. O ELISA é o teste sorológico mais usado, capaz de detectar anticorpos IgG e IgM, e obter o resultado com maior rapidez, uma vez que os anticorpos IgM são produzidos com 5 dias, após os sinais clínicos (GUBLER &
20 SATHE, 1998).

Embora várias técnicas tenham sido desenvolvidas, a PCR (reação de cadeia em polimerase) é a mais amplamente utilizada. Várias formas de PCR tais como a técnica de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição
25 reversa (RT-PCR), “Nested” RT-PCR e “Multiplex” RT-PCR são utilizadas para detectar material genômico viral com mais precisão (PARIDA, 2008).

O RT-PCR surge no final dos anos 80 como um método sensível, simples, rápido e específico à detecção do RNA viral em amostras clínicas, tecidos de
30 autópsias, grupos de mosquitos e larvas, além de culturas de células

infectadas. Mais recentemente, a PCR quantitativa foi desenvolvida para detectar RNA de todos os sorotipos de DENV em amostras humanas e apresenta muitas vantagens sobre a RT-PCR, incluindo rapidez nos resultados, uma análise quantitativa do produto a ser analisada, baixa taxa de contaminação, alta sensibilidade e especificidade. Além disso, o PCR quantitativo é mais utilizado para detecção de cargas virais e isto facilita na análise mais precisa na competência da infecção pelos vetores da dengue (adaptado de RICHARDSON, et al., 2006; GOFFART, et al., 2009).

10 **1.5.1 PCR quantitativa**

Uma PCR convencional amplifica uma região do DNA molde ou cDNA e a duplica a cada ciclo da reação, para que, ao final dela a quantidade de produto final seja comparada com uma amostra padrão. A análise do produto amplificado ocorre quando o DNA amplificado na PCR é fracionado gel. A PCR quantitativa é uma variação da PCR capaz de quantificar DNA/RNA no final de cada ciclo da reação. A quantificação somente é possível com o uso de sondas fluorescentes e ligantes de DNA dupla fita. Durante a reação, os sinais fluorescentes emitidos, vão sendo plotados em uma curva de amplificação durante toda a reação. Quanto maior a quantidade do material a ser amplificado, mais cedo ocorre a amplificação (INVITROGEN).

25

Uma PCR quantitativa acontece em três estágios: desnaturação (ativação da DNA polimerase, geralmente a 95°C); pareamento (temperatura de acordo com o cálculo da temperatura de dissociação (T_m °C) dos iniciadores, geralmente 5°C abaixo do T_m °C dos iniciadores); extensão (entre 70°C e 72°C a atividade da DNA polimerase é ótima e a extensão ocorre a uma taxa de 100 nt por segundo). Em casos de fragmentos de tamanho pequeno, a temperatura de extensão ocorre junto com a de pareamento, em um único passo (INVITROGEN).

30

Um dos pontos primordiais à qualidade da qPCR, para amostras de RNA, é a reação de transcrição reversa. É indicado o uso de temperaturas mais altas nesta reação, que além de sintetizar o cDNA é preciso ter uma atividade ótima em temperaturas mais altas devido as estruturas secundárias do RNA e em casos de usar iniciadores gene específicos (INVITROGEN).

A quantidade de DNA amplificado é medida pela fluorescência emitida no final de cada ciclo. Durante os ciclos 3 ao 15, aproximadamente, há uma emissão de fluorescência que é ainda indistinguível e, portanto são considerados os ruídos ou *baseline* da reação. Para este caso, são usadas referencias passivas que normalizam a fluorescência da reação, eliminando as fluorescências basais. Em seguida, o sinal da fluorescência aumenta exponencialmente e pode, ou não, o ultrapassar o *threshold*, que é um nível 50% acima das amplificações inespecíficas. O número de ciclos em que o sinal de fluorescência ultrapassa o *threshold* é conhecido como *cycle threshold* (Ct) e é usado para calcular o número de cópias de DNA. Após alguns ciclos o sinal emitido alcança a fase de *plateau* e inicia o processo de formação da curva de dissociação. Nesta fase, os marcadores fluorescentes se dissociam do DNA amplificado, que desnatura em DNA fita simples após alcançar a temperatura de dissociação que é a específica da reação (LUTFALLA, et al., 2006; INVITROGEN).

Uma qPCR absoluta é usada para quantificar uma amostra tendo como base diluições de amostras padrão, conhecida como curva padrão. O coeficiente linear ou R^2 é o cálculo da regressão linear das diluições que compõem a curva padrão. O valor de R^2 indica o ponto do Ct de cada diluição, sendo os valores 0,99 e 1, considerados perfeitos. O coeficiente de regressão é o valor calculado pelo R^2 que indica a eficiência da amplificação da reação. Os valores de -3.32 indicam uma eficiência de 100% (INVITROGEN).

Como a qPCR é uma análise quantitativa da expressão de genes é necessário usar de genes internos, das amostras testadas, que sirvam como um controle interno e garantem a reprodutibilidade do método (INVITROGEN).

5

10

15

20

25

30

II. JUSTIFICATIVA

Os quatro sorotipos do *Dengue virus* são predominantes nos países tropicais e subtropicais do mundo e todos podem causar síndromes auto-limitadas, como a febre do dengue (FD), quanto de caráter mais grave que é caracterizada pela febre hemorrágica do dengue (FHD) e a síndrome do choque do dengue (SCD). As duas manifestações clínicas da doença são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, além de representar um grande problema de saúde pública.

10

O aumento da densidade populacional dos vetores, favorecido pelo surgimento de criadouros das larvas, é um dos fatores que contribuem com a gravidade da doença.

15 Atualmente, não existem agentes terapêuticos específicos para a dengue e a única medida disponível para bloquear a transmissão da doença é o controle do mosquito vetor. Além das aplicações de inseticidas, a forma mais efetiva no combate ao vetor é a redução dos locais de oviposição do mosquito. No Brasil o método mais utilizado é o monitoramento de larvas, o qual utiliza índices entomológicos baseados nas formas imaturas do mosquito. Apesar disso, é necessário fazer uma estimativa da densidade da população do vetor e uma melhor compreensão da biologia do vetor.

20

A competência vetorial refere-se ao potencial do artrópode tornar-se infectado por via oral e conseguir manter a replicação viral, a disseminação e a transmissão do vírus. A compreensão da competência vetorial, tanto na população do mosquito vetor quanto individual, é necessária para a implementação de um programa de combate e erradicação do vetor.

25

O mosquito pode adquirir o vírus quando ingerir sangue contaminado com DENV, por transmissão venérea, durante a cópula, e também por via transovariana ou vertical, que é da fêmea para a progênie. Alguns estudos já revelaram a existência da forma imatura do vetor, coletada em campo, infectada com DENV. Contudo, é preciso utilizar métodos mais sensíveis para que possa ser feito uma melhor análise da transmissão vertical em larvas de *Aedes sp*, coletadas em campo.

O uso do método da PCR quantitativa (qPCR) é capaz de detectar quantidades mínimas de cópias de DENV usando amostras, com concentrações conhecidas, como padrão. Vários estudos já vêm estabelecendo essa metodologia com mosquito de *Aedes sp*, tanto infectados em laboratórios quando capturados em campo. Porém, é preciso analisar estes aspectos em casos de transmissão vertical, para que se possa verificar a densidade de ovos e larvas de *Aedes sp*, infectados em uma determinada região.

A maioria das pesquisas que utilizam a qPCR usam reagentes comerciais para desenvolver a técnica, o que contribui com um custo mais elevado. Por este motivo que este trabalho propôs desenvolver uma qPCR, precedida da reação de transcrição reversa, com uma mistura composta por reagente produzidos no Laboratório para detectar DENV em pools de larvas de *Aedes sp*.

Além de usar misturas na qPCR, este estudo verificou a sensibilidade do método amplificando a região 5'UTR do genoma do DENV, que é comum aos 4 sorotipos. Também foram desenvolvidos neste estudo, iniciadores normalizadores, com o intuito de detectar o gene da glutamino sintetase, responsável pela síntese da camada periotrófica, uma das barreiras físicas presentes no mesentério do vetor.

Por todos estes motivos é que o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma qPCR para detecção de DENV em larvas de *Aedes sp*

5

10

15

20

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- 5 Desenvolvimento de uma qPCR para detecção de DENV em larvas de *Aedes sp*

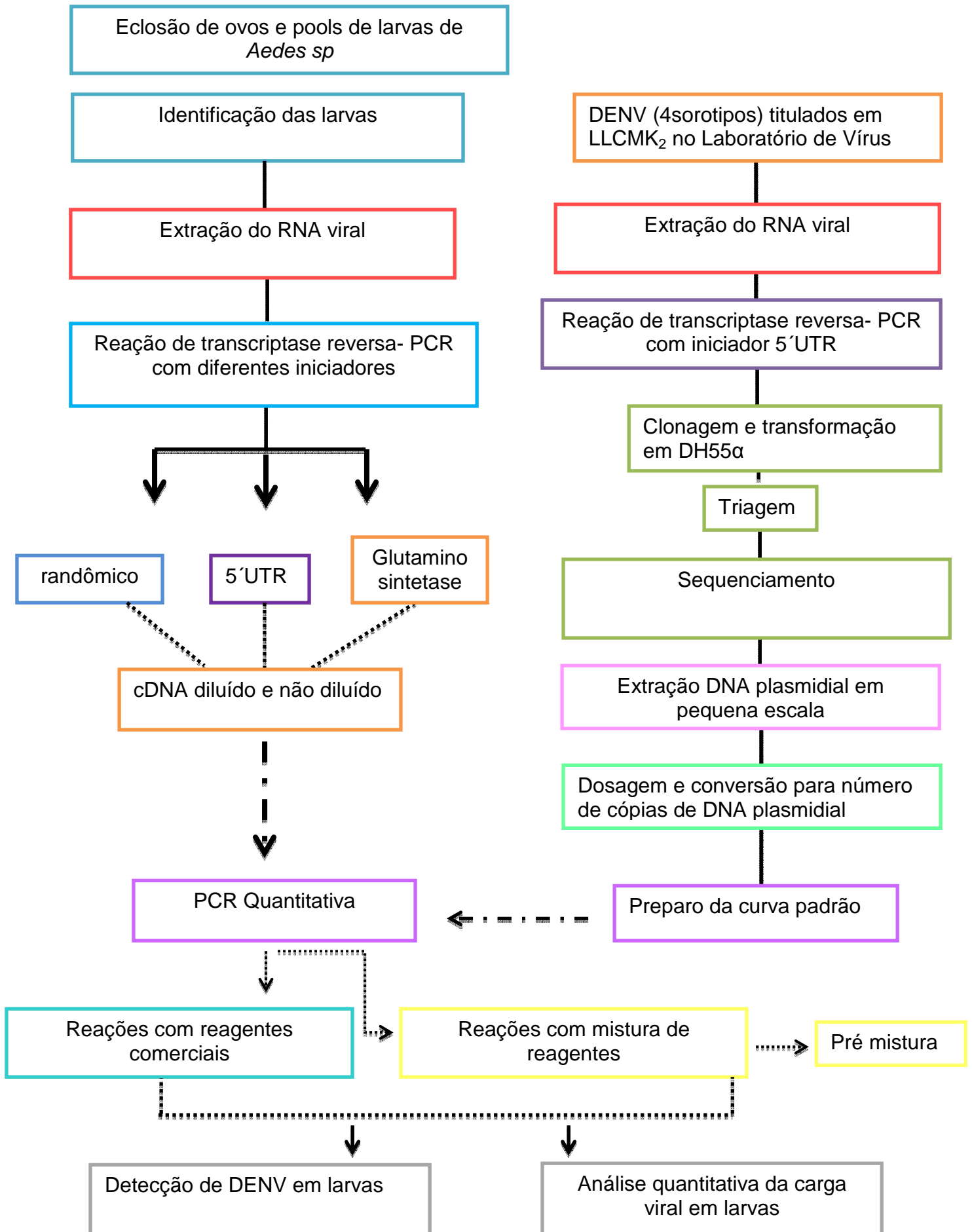
3.2 Objetivos específicos

- 10 1. Identificar morfologicamente as larvas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* coletadas;
2. Padronizar uma técnica de PCR quantitativo para detectar cDNA de DENV em pools de larvas;
- 15 3. Selecionar e padronizar iniciadores que possam funcionar como normalizadores da reação de PCR em tempo real.

20

25

FLUXOGRAMA DE TRABALHO



IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e armazenamento das amostras

5 A Pesquisa Vetorial Especial (PVE) consiste na execução de pesquisa eventual de *Aedes aegypti* em função de denúncia de sua presença ou quando há interesse de alguma pesquisa entomológica diferenciada. As amostras de larvas da PVE foram coletadas pela Prefeitura de Belo Horizonte durante os meses de maio a dezembro de 2010 e enviadas ao Laboratório de Vírus
10 semanalmente para serem analisadas.

A Prefeitura de Belo Horizonte vem trabalhando, em suas atividades de rotina, com o monitoramento das populações de *A. aegypti* e *A. albopictus*, através da pesquisa de ovos em unidades domiciliares e, em pontos estratégicos,
15 utilizando a armadilha de oviposição, também conhecida como Ovitampa. A armadilha empregada é de recipiente plástico, de cor preta e com capacidade para 500mL.

As armadilhas foram colocadas nas nove regionais da cidade de Belo Horizonte (FIGURA 12), sendo realizada a coleta de 5 regionais em uma
20 semana e de 4 na outra semana. A distância de uma armadilha a outra foi de 400 metros e sua localização foi de acordo com o mapa fornecido pela Prefeitura, que é analisado por uma equipe capacitada para numerar os quarteirões existentes neles. A cada sete dias as armadilhas de oviposição
25 eram substituídas e feitas a coleta dos ovos. Após a coleta, os ovos foram enviados, ao Laboratório de Vírus, em palhetas feitas com madeira Eucatex, tendo 12,5cm de comprimento e 2 cm de largura. A quantidade por pool foi variável, uma vez que este valor estava relacionado com o número de ovos eclodidos por palheta e com a quantidade de larvas coletadas em cada
30 localidade. As larvas de *A.aegypti* e *A. albopictus*, nos estágios L3-L4, foram identificadas pelas diferenças entre os sifões respiratórios e pelo VIII segmento.

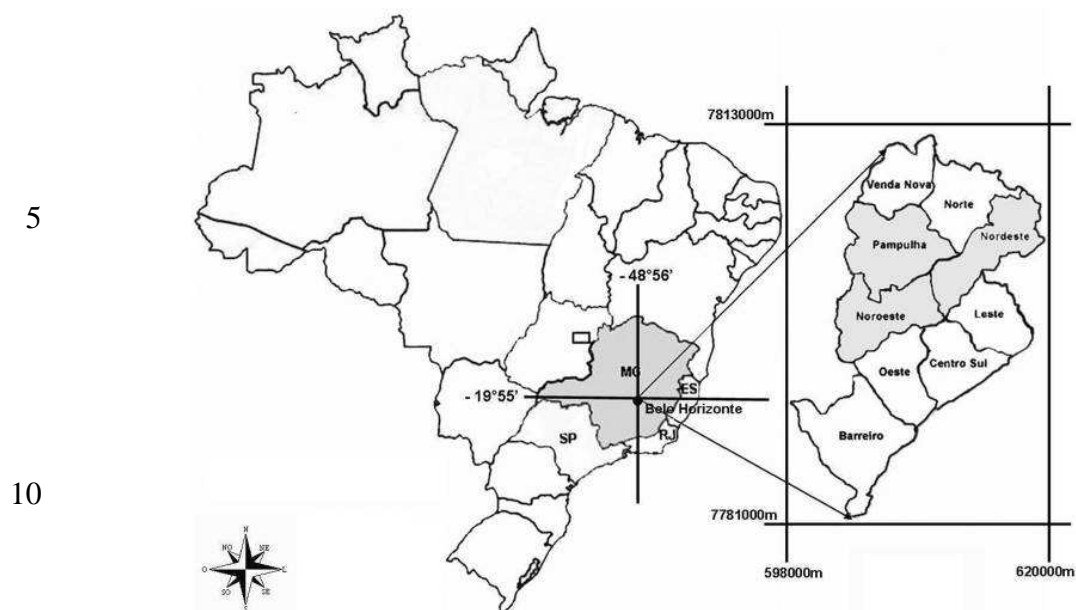


FIGURA 12: Mapa da cidade de Belo Horizonte-MG. Estado de Minas Gerais com a cidade de Belo Horizonte. Em detalhe as regionais da cidade aonde foram feitas as coleta dos pools de larvas de *Aedes sp* durante 2010-2011. Fonte: FIGUEIREDO, *et al.*, 2008.

20

As amostras de *Dengue virus* 1 e 2 foram isolados no município de Ribeirão Preto (SP) e multiplicadas em cérebro de camundongo e em células em cultivo, sendo gentilmente cedidos pelo Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo.

25

A amostra *Dengue virus* 3 foi gentilmente cedido pelo Dr. Pedro Vasconcelos do Instituto Evandro Chagas (Belém-PA).

30

A amostra *Dengue virus* 4 foi isolada em 1981, na cidade de Boa Vista, sendo gentilmente cedida pelo Dr. Maurício Nogueira.

Os vírus foram multiplicados em células C6/36 e foram titulados em células LLCMK2 no Laboratório de Vírus apresentando os seguintes títulos: DENV-1 ($3,8 \times 10^5$); DENV-2 ($4,0 \times 10^6$); DENV-3 ($2,7 \times 10^6$); DENV-4 ($3,2 \times 10^6$).

4.2 Extração de RNA viral

O RNA dos vírus multiplicados em células C6/36 e dos pools de larvas de *Aedes sp* foram extraídos com o auxílio do Kit QIAmp[®] Viral RNA (QIAGEN[®],
5 EUA).

Um volume de 140 µL do sobrenadante foi lisado pela solução AVL (carreador de RNA), em seguida, aplicados a uma coluna com afinidade para RNA e centrifugadas a 8.000 x g por 1 minuto. As amostras foram em seguida lavadas
10 com tampão AW1(isotiocianato de guanidina) e com a solução tampão AW2 (tampão de lavagem). Terminada a lavagem, os RNAs foram eluídos das colunas, pela solução AVE olhar composição e armazenados em microtubos a -70°C.

15

4.3 Transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação de DNA foram utilizados iniciadores específicos para os
20 genes da glutamino sintetase dos mosquitos e da região 5'UTR (não traduzida) dos vírus.

Todas as amostras de “pools” de larvas e de isolados virais utilizadas neste estudo foram primeiramente submetidas a uma transcriptase reversa para
25 sintetizar uma cadeia complementar de DNA ou cDNA. O produto desta reação serviu como molde na PCR em que foram utilizados os iniciadores listados na TABELA 1 e na TABELA 2.

30

5 **TABELA 1: Iniciadores utilizados para a amplificação da região 5'UTR**

Iniciador	Sequência	Posição no genoma*	Tamanho ou amplicon (pb)
5'UTR- F	5'-AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA-3'	1-23	148pb
5' UTR- R	5'-CGCGTTTCAGCATATTGAAAG-3'	129-149	

*Posição referente ao DENV-3 amostra H87. Número de acesso ao GenBank: M93130 (AQUINO *et al.*, 2006).

10

15 **TABELA 2: Iniciadores utilizados para a amplificação do gene da glutamino sintetase do *Aedes sp.***

Iniciador	Sequência	Posição no genoma*	Tamanho ou amplicon (pb)
Glusin F	5'-CGAGTTTTCCATCGGTGGAAGCC-3'	121-143	190pb
Glusin R	5'-CTGAATGCCATCTTCTCTTAGTCCTC-3'	286-311	

* Posição referente ao RNAm da Glutamino sintetase, amostra AF004351.1

20

25

Para a RT foram utilizadas as seguintes condições salinas e enzimáticas: RT-PCR 5X (Tris a 250mM pH 8.9, MgCl₂ a 15mM, KCl a 375mM, DTT a 50mM), 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 200U M-MLV RT (Promega Corporation-EUA), 20U de RNAsin (Ribonuclease Inhibitor-Promega), 10pmol dos iniciadores específicos anti senso, 10µL de RNA e água para completar o volume de 25µL. O RNA foi incubado com o iniciador a 70°C por 5 minutos, seguido de um banho de gelo até o acréscimo do restante dos reagentes. A reação foi incubada a 42°C por 60 minutos, seguida de uma incubação a 72°C por 10 minutos.

10

Como controle negativo da reação foi usado 10µL de água estéril e como controle positivo RNA de vírus. O cDNA foi estocado a -20°C até o processo de PCR.

15 Para a PCR foi utilizado 2µL de tampão 10X, 2,0mM de MgCl₂, 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 10pmol dos iniciadores específicos, 1µL de amostra e água estéril para completar o volume para 20µL de reação.

20 As condições térmicas da PCR foram as seguintes: uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 60 segundos (desnaturação), 60°C por 60 segundos (pareamento), 72°C por 60 segundos (polimerização) e por último uma extensão de 72°C por 10 minutos. A reação foi processada no termociclador Mastercycler[®] (Eppendorf, Hamburg, Alemanha)

30 Como controle positivo da PCR foi empregada cDNA de vírus e água estéril foi usada como controle negativo. Do produto obtido na PCR foram usados 10 µL misturados com 2 µL do tampão de aplicação (Azul de Bromofenol 2,5%, TAE 10X e glicerol 50%) para análise em gel de poli-acrilamida 8% (acrilamida e bis-acrilamida ultra pura 30%, Invitrogen), sob a voltagem de 100V em tampão TBE 1X (0,089M TRIS-ACETATO, 0,089M ácido bórico, 0,002M EDTA) e

corados pela prata. Os fragmentos foram analisados comparativamente ao padrão de 100 pb DNA marcador (Promega, Madison, WI U.S.A.).

5 A coloração com nitrato de prata foi feita empregando-se a solução fixadora A (40% metanol, 10% ácido acético, v/v) e solução fixadora B (10% etanol, 5% ácido acético v/v) seguida de uma incubação com solução oxidante (bicromato de potássio 0,034 M, ácido nítrico 0,032 M) por 5 minutos. Os géis foram corados com nitrato de prata (0,6 g/300 ml de água) por 20 minutos e lavados com água deionizada por 1 minuto, acrescentando-se posteriormente a solução
10 reveladora (5,9 gramas de carbonato de sódio, 0,1 gramas de paraformaldeído em 200mL de água) por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução de ácido acético 5% e os fragmentos visualizados e fotografados.

15 **4.4 Clonagem da região 5'UTR do *Dengue virus* em sistema procarioto**

4.4.1 Clonagem em pGEM-T

Os fragmentos de DNA de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 amplificados por PCR foram quantificados em espectrofotômetro (Nanodrop 1000), e então
20 inseridos no plasmídeo pGEM-T de acordo com a técnica descrita pelo fabricante do kit pGEM-T *easy vector system* (Promega Corporation, EUA).

O inserto foi utilizado na proporção de 3:1 (inserto:plasmídeo) na reação de ligação. A reação de ligação foi feita com 5 µL de tampão de ligação 2X (60mM
25 TRIS-HCl pH 7,8; 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% polietilenoglicol), 2 µL de pGEM-T, 2 µL de T4 DNA ligase, 1 µL de inserto e água para um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 4°C por 16 horas.

Para a transformação foram utilizados 5 µL da reação de ligação e 100 µL de
30 bactéria competente DH5α (SAMBROOK *et al.* 1989) descongelada em banho de gelo. Os tubos foram levemente agitados e incubados em banho de gelo por 30 min até o choque térmico por 3 min a 42°C seguidos de um novo banho de

gelo por 2 min. Foi adicionado 1 mL de meio LB 1X sem antibiótico e feito uma incubação a 37°C por 1 hora. A cultura bacteriana foi centrifugada a 14.000 rpm (rotor H1000B- Sorvall RT6000B) por 5 min, o sobrenadante foi removido e o sedimento homogeneizado e plaqueado em meio LB-ágar (1% bacto-triptona; 0,5% bacto-extrato de levedura; 1% NaCl; 1% Ágar) contendo ampicilina (50 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Controles do crescimento de bactérias competentes não transformadas em placas LB-ágar foram feitas na presença e ausência de ampicilina.

10 As colônias foram selecionadas aleatoriamente e multiplicadas em 1,0 mL de meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL) e incubadas em agitador (Shaker Superohm G-25, Brasil) por 1 hora a 37°C sob agitação de 180 rpm. Os clones foram triados por PCR, utilizando iniciadores específicos e/ou iniciadores do plasmídeo pGEM-T e os produtos foram fracionados gel de agarose.

15

Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose ultra-pura 2% diluída com TAE 1X (0,04M TRIS-ACETATO, 0,001M EDTA) e corados com 0,5µg/mL de brometo de etídio. Foram usados 10 µL da amostra misturada com 2 µL do tampão de aplicação (Azul de Bromofenol 2,5%, TAE 10X e glicerol 50%) e um padrão de 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, WI U.S.A.) como marcador molecular. O fracionamento foi feito em 100V e os fragmentos foram visualizados após exposição à luz UV em transiluminador e fotografados.

25 Foi utilizado o Kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega Corporation – EUA) para a obtenção do plasmídeo em pequena escala. Os clones foram crescidos em 10 mL de meio LB contendo ampicilina por 16 horas à temperatura de 37°C com agitação de 180 rpm. Após descarte do sobrenadante, 300 µL de solução de ressuspensão (50mM Tris-HCl- pH 7.5; 10mM EDTA; 100µg/ml RNase A) foi adicionado e homogeneizado em agitador vórtex seguida da adição de 300 µL de solução de lise(0.2M NaOH; 1% SDS) e a homogeneização feita por inversão do tubo por 4 vezes. Foi adicionado 300 µL de solução de neutralização (4.09M guanidine hydrochloride; 0.759M potassium acetate; 2.12M glacial acetic acid- Final pH is approximately 4.2.), com homogeneização

30

e centrifugação do material a 14.000 rpm por 15 min, em microcentrífuga Eppendorf 5415C. O sobrenadante foi transferido para uma coluna, centrifugado e lavado com 2,0 mL de solução de lavagem (162.8mM potassium acetate; 22.6mM Tris-HCl- pH 7.5; 0.109mM EDTA- pH 8.0). O DNA foi eluído da coluna com água, por centrifugação a 14.000 rpm, quantificado em espectrofotômetro ND-100 (NanoDrop Technologies) e armazenado a -20°C.

4.5 Sequenciamento e análise das sequências de DNA

10

O sequenciamento foi feito pelo o método descrito por SANGER *et al.*, (1977) em sequenciador automático capilar Mega Bace1000 (Amersham/Pharmacia, Suécia), utilizando iniciadores universais M13 e o Kit *Dy Enamic ET Dye Terminator cycle Sequencing Kit for Megabace*, obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

15

Para cada fragmento foram feitas seis reações de sequenciamento, três com cada um dos iniciadores. A montagem e visualização das sequências finais foram obtidas a partir da análise dos cromatogramas, utilizando o programa CAP3 *Sequence Assembling Program*. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” através do programa BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- Basic Local Alignment Tool (ALTSUCHL *et al.*, 1990). Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram realizados com o auxílio do programa MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), utilizando-se o parâmetro Clustal W versão 1.6 (THOMPSON *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 2004; <http://megasoftware.net>).

25

30

4.6 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

4.6.1 Preparo de uma pré- mistura

A metodologia teve como sistema de detecção 1µL do corante Eva Green™ (Biotium, Hayward, CA) 20X, que representa uma nova geração de ligantes de DNA e como condições salinas e enzimáticas as seguintes descrições: 2µL de tampão 10X, 2,0mM de MgCl₂, 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1U de Taq DNA polimerase, 10pmol dos iniciadores específicos, 2µL de amostra e água estéril para completar o volume para 20µL de reação. O *Rox reference dye* 50X foi usado no preparo de algumas reações.

Foi preparada uma pré-mistura composta de: 2µL de tampão 10X, 2,0mM de MgCl₂, 1µL de Eva Green™ (Biotium, Hayward, CA) 20X, 0,2µL de *Rox reference dye* 50X e água para uma concentração 2X. A pré-mistura foi produzida de maneira que, para 20 µL de uma reação foram utilizados 10 µL do pré-mistura e adicionados os demais reagentes: 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1U de Taq DNA polimerase, 10pmol dos iniciadores específicos, 2µL de amostra e água estéril para completar o volume para 20µL de reação. Esta pré-mistura foi comparada com o Master Mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems).

As condições térmicas da PCR quantitativa foram as seguintes: uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 40 e/ou 45 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação), 60°C por 15 segundos (pareamento), 72°C por 15 segundos (polimerização) e por último uma curva de melting. A reação foi feita no termociclador *StepOne*® da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*® versão 2.1 da Applied Biosystems.

Como controle negativo da reação foi usado água estéril para substituir as amostras correspondentes. Nos controles positivos foram usadas diluições do pGEMT-5'UTR de DENV.

V- RESULTADOS

5.1 Identificação e caracterização molecular das amostras.

5.1.1 Diferenciação morfológica e identificação dos “pools” de larvas de *Aedes sp.*

- 5 Dentre as diversas amostras coletadas no campo pelo Laboratório de Entomologia da Prefeitura de Belo Horizonte-MG, 30 foram identificadas morfológicamente separando-as em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A localização da coleta e a quantidade de larvas por “pool” foi registrada. Dentre as larvas analisadas, 30 foram obtidas a partir de ovos enviados em palhetas e
- 10 eclodidos no Laboratório de Vírus e o restante foi obtido como larvas que eclodiram na natureza (TABELA 3).

TABELA 3: Identificação e quantificação dos “pools” de larvas

Mês da coleta	Nome do “pool”	Forma de coleta no campo	Regional de Belo Horizonte	Identificação	Quantidade por “pool”
Junho-semana 1	1	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50
Junho-semana 1	2	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50
Junho-semana 1	3	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50
Junho-semana 1	4	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50
Junho-semana 1	5	larva	Noroeste	<i>Aedes albopictus</i>	1
Junho-semana 1	6	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50
Junho-semana 1	7	larva	Leste	<i>Aedes aegypti</i>	50
Junho-semana 1	8	larva	Centro-sul	<i>Aedes aegypti</i>	52
Junho-semana 1	9	larva	Pampulha	<i>Aedes aegypti</i>	15
Junho-semana 2	1	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	2	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	3	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	4	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	5	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	6	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	7	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	8	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	9	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	10	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	11	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	12	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	13	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	14	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	15	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	16	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-

Junho-semana 2	17	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	18	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	19	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	20	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	21	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	22	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	23	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	24	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	25	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	26	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	27	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	28	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	29	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Junho-semana 2	30	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-
Outubro-semana 1	1	larva	Leste	<i>Aedes aegypti</i>	8
Outubro-semana 1	2	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	10
Outubro-semana 1	3	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	8
Outubro-semana 1	4	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	5
Outubro-semana 1	5	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	6
Outubro-semana 1	6	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	9
Outubro-semana 1	7	larva	Oeste	<i>Aedes aegypti</i>	5
Outubro-semana 1	8	larva	Oeste	<i>Aedes aegypti</i>	7
Outubro-semana 1	9	larva	Oeste	<i>Aedes aegypti</i>	1
Dezembro-semana 3	1	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	15
Dezembro-semana 3	2	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	13
Dezembro-semana 3	3	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	14
Dezembro-semana 3	4	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	11
Dezembro-semana 3	5	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	10
Dezembro-semana 3	6	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	9
Dezembro-semana 3	7	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	5
Dezembro-semana 3	8	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	40
Dezembro-semana 3	9	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	3
Dezembro-semana 3	10	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	5
Dezembro-semana 3	11	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	12
Dezembro-semana 3	12	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	3

* Nas amostras com (-) não foi feito a contagem das larvas no pool.

Os ovos, enviados em palhetas, foram eclodidos e analisados, como as outras amostras, na fase larval L3-L4. As principais diferenças morfológicas, analisadas foram: aspecto da escama presente no segmento VIII e detalhe do pécten do sifão respiratório.

5.2 Detecção de DENV por RT-PCR empregando iniciadores para a região 5'UTR.

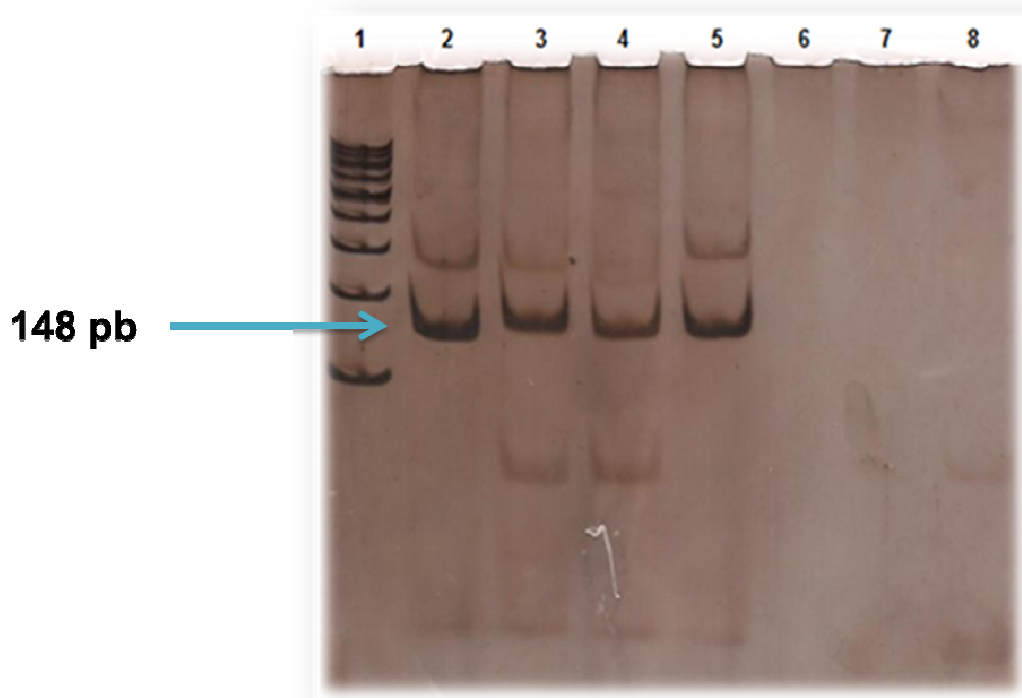
5.2.1 Análise da amplificação do DNA da região 5'UTR do DENV usando vírus e “pools” de larvas

5

Com o intuito de amplificar regiões específicas do DENV em amostras de larvas de *Aedes sp*, foi feita uma busca na literatura de iniciadores específicos. Aquino *et al.*,(2006) desenvolveram iniciadores, que foram empregados em PCR quantitativo, e que amplificam apenas a região 5'UTR de DENV, sem que ocorra a amplificação de genoma de outros *Flavivirus* brasileiros.

O cDNA dos DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e de “pools” de larvas de *Aedes sp* empregando os iniciadores para a região 5'UTR serviram de molde a PCR. O DNA amplificado foi fracionado em gel de poliacrilamida 8% a 100V e visualizado após coloração com a prata (FIGURA 12 e 13). Foram amplificados fragmentos de DNA de 148 pb dos 4 sorotipos do DENV e nenhuma amplificação foi observada no controle negativo, que usou água estéril em substituição às amostras. Dos 19 “pools” de larvas testadas, 10 apresentaram uma amplificação de 148pb, correspondente a região 5'UTR do DENV.

25



- 15 **FIGURA 12: Amplificação da região 5'UTR do DENV empregando iniciadores específicos.** Os isolados de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 foram submetidos a transcrição reversa e ao ensaio de PCR, nos quais foram utilizados iniciadores para a região 5'UTR de DENV. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb; Canaleta 2: DENV-1; Canaleta 3: DENV-2;
- 20 Canaleta 4: DENV-3; Canaleta 5: DENV-4; Canaleta 8: água (controle negativo). Os amplificados foram fracionados em gel poliacrilamida 8% sob a voltagem de 100V.

25

30

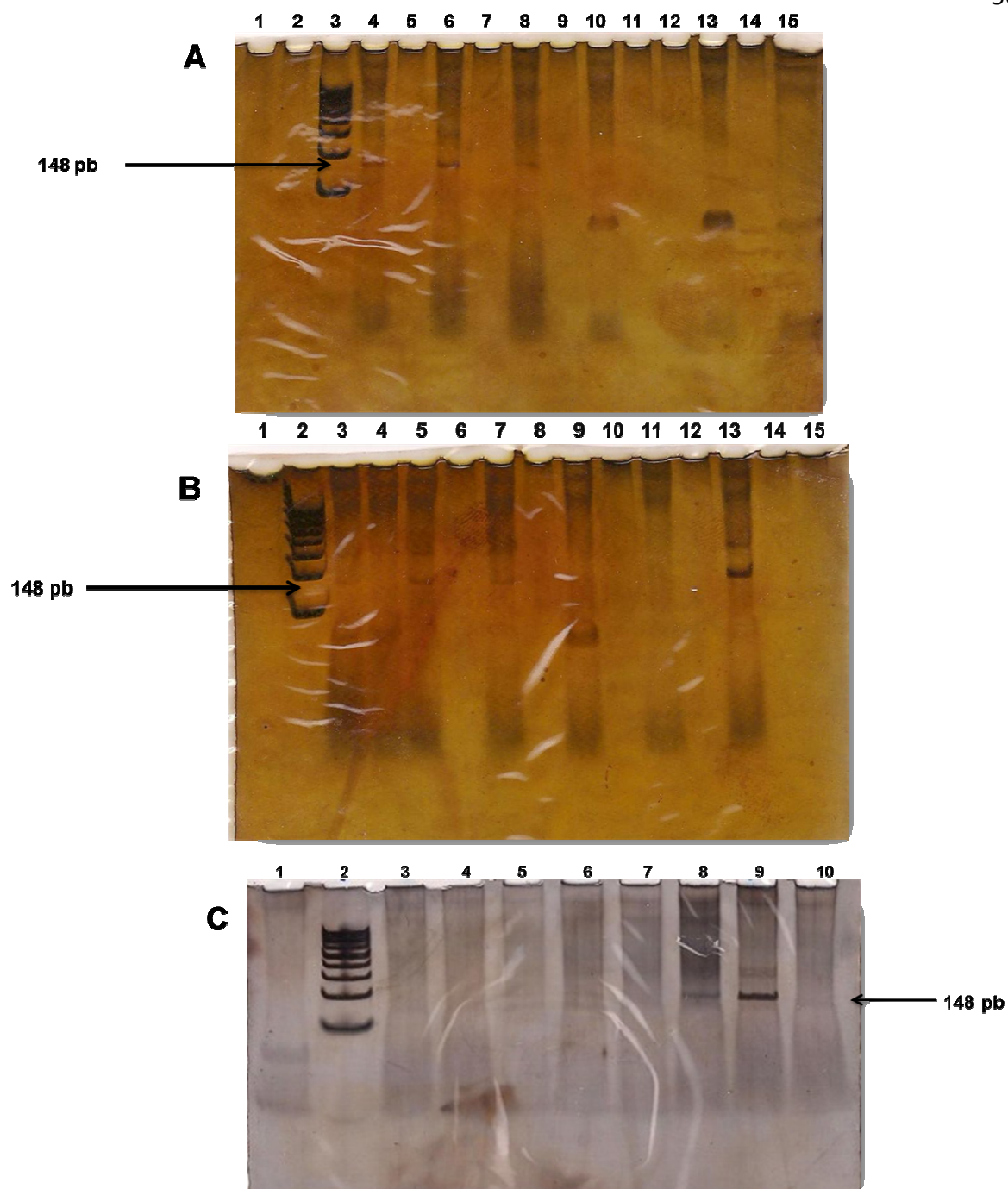


FIGURA 13: Amplificação de DNA da região 5'UTR do DENV por RT-PCR em "pools" de larvas. Os RNA dos "pools" das larvas foram submetidos a RT-PCR, empregando os iniciadores da região 5'UTR de DENV e o produto foi fracionado em PAGE 8% a 100V. **A:** Canaleta 3: Padrão de tamanho molecular de 100pb; Canaleta 4: "pool" 8- junho-semana 1; Canaleta 6: "pool" 9- junho-semana 1; Canaleta 8: "pool" 10- junho-semana 1; Canaleta 13: controle negativo (água estéril). **B:** Canaleta 2: Padrão de tamanho molecular de 100pb; Canaleta 3: "pool" 1- junho-semana 1; Canaleta 4: "pool" 2- junho-semana 1;

Canaleta **5**: “pool” 3- junho-semana 1; Canaleta **7**: “pool” 4- junho-semana 1;
Canaleta **9**: “pool” 5- junho-semana 1; Canaleta **11**: “pool” 6- junho-semana 1;
Canaleta **13**: “pool” 7- junho-semana 1. **C**: Canaleta **1**: “pool” 1- outubro-
semana 1; Canaleta **2**: padrão com tamanho molecular de 100 pb; Canaleta **3**:
5 “pool” 2- outubro-semana 1; Canaleta **4**: “pool” 3- outubro-semana 1; Canaleta
5: “pool” 4- outubro-semana 1; Canaleta **6**: “pool” 5- outubro-semana 1;
Canaleta **7**: “pool” 6- outubro-semana 1; Canaleta **8**: “pool” 7- outubro-semana
1; Canaleta **9**: “pool” 8- outubro-semana 1; Canaleta **10**: “pool” 9- outubro-
semana 1.

10

15

20

25

30

5.2.2 Teste de sensibilidade de temperatura

Para dar continuidade aos estudos, foi feito o teste usando os iniciadores para a região 5'UTR com o intuito de detectar DENV nas amostras de larvas. Nesta
5 PCR foram testadas várias temperaturas de pareamento deste iniciador para otimizar as condições de reação.

As condições térmicas da PCR, processada no termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), foram as seguintes: uma desnaturação
10 inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 60 segundos (desnaturação), 60°C por 60 segundos (pareamento), 72°C por 60 segundos (polimerização) e por último uma extensão de 72°C por 10 minutos. Porém, como intuito do teste era verificar qual seria a melhor temperatura de pareamento a ser empregada, foi adotada a temperatura de 57°C como a
15 intermediária do teste e foi feito um gradiente de variação de temperatura de aproximadamente 10°C abaixo e 10°C acima deste valor. Assim, os valores registrados de temperaturas feitas em gradiente foram: 47°C, 47,5°C, 49°C, 51°C, 53,4°C, 55,8°C, 58,2°C, 60°C, 63°C, 65°C, 66,5°C e 67°C. O produto da PCR foi fracionado em gel de poliacrilamida 8% a 100V e corados por prata
20 (FIGURA 14).

Foi usado como controle positivo para cada temperatura de pareamento testada 8ng do DNA plasmidial pGEMT-5'UTR e água estéril como controle negativo de cada temperatura em teste.

25

Os produtos amplificados de cada temperatura de pareamento testados revelaram uma amplificação eficiente entre as temperaturas de 47°C à 60°C e uma diminuição da intensidade da amplificação quando esta temperatura ultrapassa a de 60°C. Como estes iniciadores seriam testados posteriormente
30 em larvas de *Aedes sp*, ficou estabelecido a temperatura de 60°C como a de pareamento.

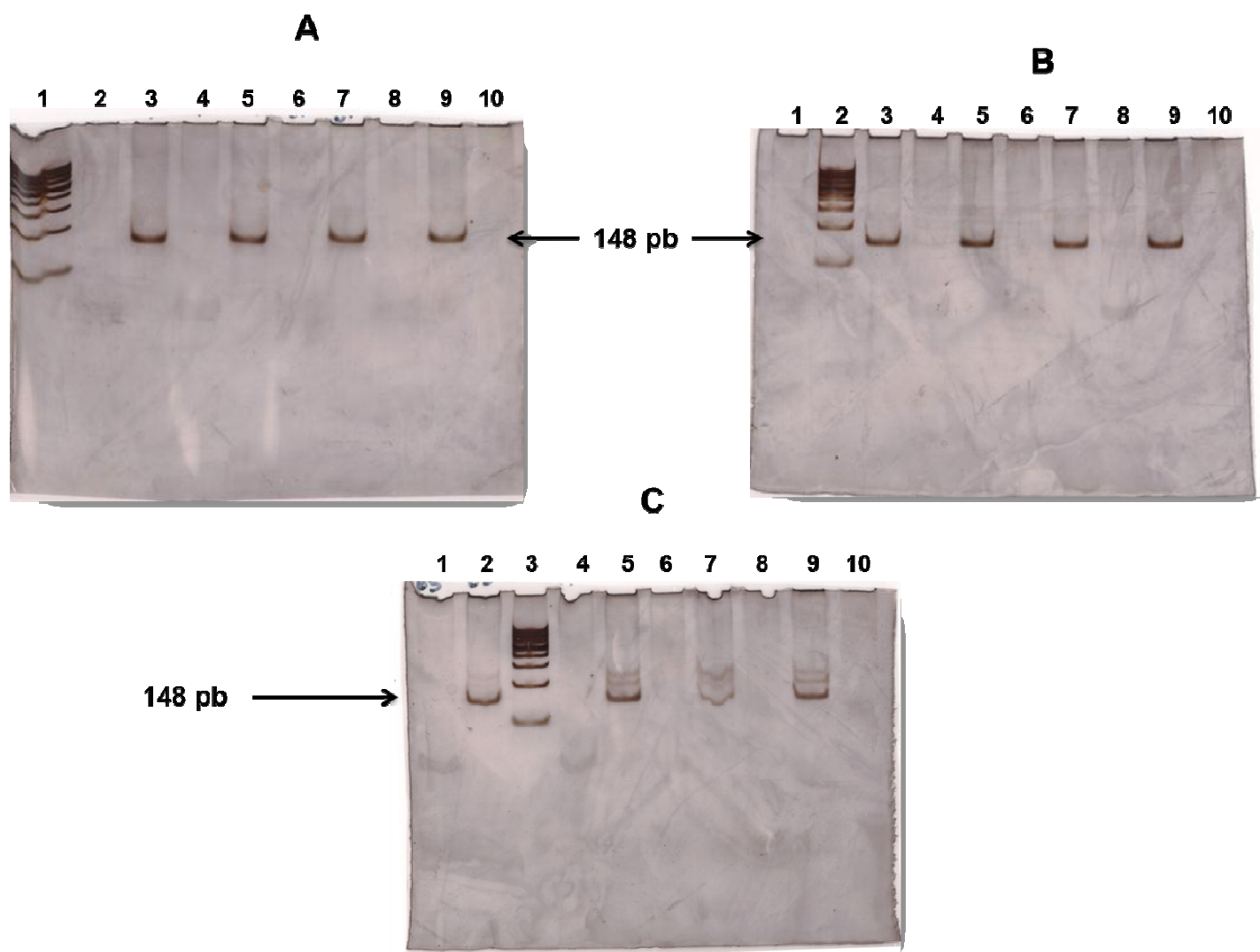


FIGURA 14: Avaliação da eficiência de amplificação de DNA em diferentes temperaturas de pareamento testadas em gradiente. Foi feito uma PCR em gradiente para testar qual a temperatura de pareamento mais eficiente usando DNA plasmidial como controle positivo (CP) e água como o negativo da reação (CN). O produto foi fracionado em PAGE 8% a 100V e visualizados após coloração por prata. **A:** Canaleta 1: padrão de tamanho molecular de 100 pb; Canaleta 2: CN de 47°C, Canaleta 3: CP de 47°C, Canaleta 4: CN de 47,5°C; Canaleta 5: CP de 47,5°C, Canaleta 6: CN de 49°C, Canaleta 7: CP de 49°C, Canaleta 8: CN de 51°C; Canaleta 9: CP de 51°C. **B:** Canaleta 1: CN de 53,4°C; Canaleta 2: padrão molecular de 100 pb, Canaleta 3: CP de 53,4°C, Canaleta 4: CN de 55,8°C; Canaleta 5: CP de 55,8°C, Canaleta 6: CN de 58,2°C, Canaleta 7: CP de 58,2°C, Canaleta 8: CN de 60°C; Canaleta 9: CP de

60°C. **C:** Canaleta **1:** CN de 63°C; Canaleta **2:** CP de 63°C, Canaleta **3:** padrão molecular de 100 pb, Canaleta **4:** CN de 65°C; Canaleta **5:** CP de 65°C, Canaleta **6:** CN de 66,5°C, Canaleta **7:** CP de 66,5°C, Canaleta **8:** CN de 67°C; Canaleta **9:** CP de 67°C.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

5.2.3 Amplificação do DNA da região 5'UTR clonada em pGEM-T

Com o objetivo de obter um controle positivo, neste estudo, o DNA amplificado por PCR foi clonado no vetor pGEM-T e transformado em células bacterianas.

5 Foi feita uma PCR empregando os iniciadores para a região 5'UTR e uma outra usando os iniciadores do Kit pGEM-T *easy vector system* (Promega Corporation, EUA) (FIGURA 15).

10 A análise dos fragmentos de DNA amplificado confirmou a inserção das seqüências 5'UTR no sistema procarioto. Das regiões 5'UTR correspondentes aos 4 sorotipos do DENV, apenas a do DENV-2 não houve transformação das bactérias, por não ter crescido nenhuma colônia na placa.

15 O DNA plasmidial, obtido em pequena escala pelo Kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega Corporation – EUA) foi dosado em espectrofotômetro ND-100 (NanoDrop Technologies) e apresentou as concentrações de: DENV-1 (21,9 ng/μL); DENV-3 (75 ng/μL); DENV-4 (90 ng/μL).

20 O plasmídeo foi sequenciado empregando o método descrito por SANGER *et al.*, (1977) em sequenciador automático capilar Mega Bace1000 (Amersham/Pharmacia, Suécia), utilizando iniciadores universais M13 e o Kit *Dy Enamic ET Dye Terminator cycle Sequencing Kit for Megabace*, obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

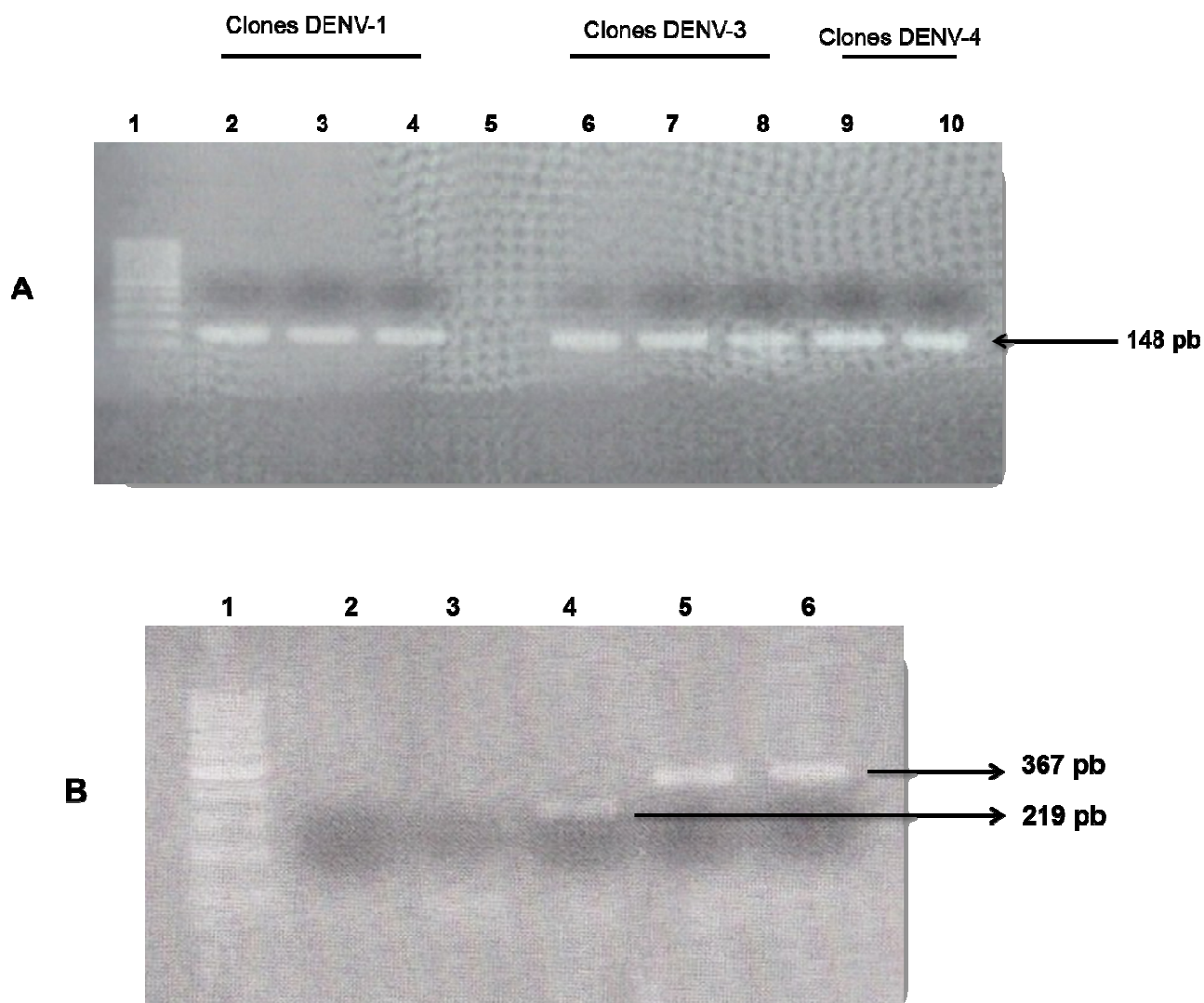


FIGURA 15: Detecção do inserto 5'UTR no vetor pGEMT por PCR. O DNA plasmidial extraído, foi amplificado por PCR empregando **A)** iniciadores 5'UTR cuja amplificação é de 148 pb e **B)** iniciadores M13 do Kit pGEM-T *easy vector system* (Promega Corporation, EUA) cuja amplificação é de 219 pb. O DNA amplificado foi fracionado a 100V em gel de agarose 1%. **A):** Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular com 100 pb; Canaletas 2 a 4: clones do DENV-1; Canaleta 5: água (controle negativo); Canaletas 6 a 8: clones do DENV-3; Canaletas 9 a 10: clones do DENV-4. **B):** Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb; Canaletas 2 a 3: água (controle negativo); Canaleta 4: clone de DENV-4 sem o inserto; Canaleta 5: clone do DENV-4 com o inserto; Canaleta 6: clone do DENV-3 com o inserto.

5.3 Desenho de iniciadores para o gene constitutivo glutaminosintetase em *Aedes sp.*

- 5 Visando avaliar a carga viral de DENV na PCR quantitativa, foi necessário obter iniciadores específicos para um gene do *Aedes sp* que funcionassem como normalizadores da reação. O gene da glutamino sintetase, por ser constitutivo, foi a região escolhida para o desenho dos iniciadores, desenvolvidos neste trabalho.
- 10 O alinhamento entre as sequências de DNA e do RNAm do gene de interesse foi feito pelo programa Clustal W versão 2.0 e as regiões entre íntrons foram as escolhidas como alvo dos iniciadores, o que permite apenas a detecção de sequências de RNA da glutamino sintetase (FIGURA 16).
- 15 Os iniciadores foram avaliados quanto à previsão de formação de dímeros (pareamento mínimo de cinco bases) e de alças (pareamento mínimo de quatro bases) através do programa OligoCalc. Não houve formação de dímeros em nenhum dos iniciadores (FIGURA 17).
- 20 As sequências dos iniciadores foram comparadas com as sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank, utilizando-se o programa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e os iniciadores foram capazes de reconhecer de forma eficiente o RNAm da glutaminosintetase do *Aedes sp.*

25

30


```

gi|dna|      TTAATGGAAAAAGGAGATATATTTTTCTGATATTTTCGATTCGTGCTTTTGCTGTCCCC 1680
gi|RNAm|     TTAATGGAAAAAGGAGATATATTTTTCTGATATTTTCGATTCGTGCTTTTGCTGTCCCC 121
*****
gi|dna|      GAGTTTTCCATCGGTATGTCATATGCGAGTGATGAATTGAGIGATATTTTTGGCTGTTAA 1740
gi|RNAm|     GAGTTTTCCATCGGT----- 136
*****

gi|dna|      TTTTAAATTTTGAAGAGGAAATGATGGTTTTTCTCTTTTCTTTCTGATTTCCAGGTGGA 1800
gi|RNAm|     -----GGA 139
*****

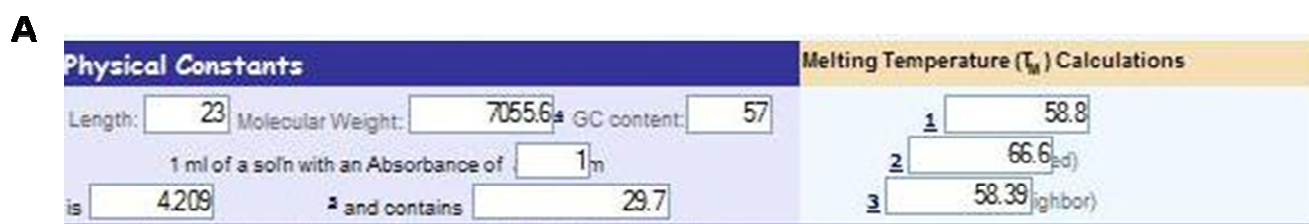
gi|dna|      AGCCAAATTCCTAGTATTGGCAATATTTCTCTGTGATATGGTGTGAGAACAAAATCAAG 1860
gi|RNAm|     AGCCAAATTCCTAGTATTGGCAATATTTCTCTGTGATATGGTGTGAGAACAAAATCAAG 199
*****

gi|dna|      AGCTACTTAAGAAACCAGAAATTGTGAGTGTGACCAAAATCAAAAAGTGTGTTTATTGTA 1920
gi|RNAm|     AGCTACTTAAGAAACCAGAAATTGTGAGTGTGACCAAAATCAAAAAGTGTGTTTATTGTA 259
*****

gi|dna|      AATTTAICTGTGTGATTACCAACAAAGAGGACTAAGAGAAGATGGCATTTCAGAGTTGTGG 1980
gi|RNAm|     AATTTAICTGTGTGATTACCAACAAAGAGGACTAAGAGAAGATGGCATTTCAGAGTTGTGG 319
*****

```

- 5 **FIGURA 16: Alinhamento de sequência de DNA com o RNAm do gene da glutamino sintetase de *Aedes sp.*** O alinhamento da sequência de DNA da glutaminosintetase (Acesso no Genbank-AF395490) com o seu RNAm (Acesso no Genbank-AF004351) foi feito através do programa Clustal W versão 2.0. As setas indicam o início e o término da sequência amplificada pelos iniciadores específicos ao gene da glutamino sintetase.
- 10



5

FIGURA 17: Características dos iniciadores normalizadores específicos ao gene de referência da glutamino sintetase do *Aedes sp.* Os iniciadores específicos ao gene da glutamino sintetase foram analisados quanto as suas características no programa OlicoCalc. **A:** Características após análise do iniciador senso (5'-CGAGTTTTCCATCGGTGGAAGCC-3'), cuja posição no genoma é de 121- 143. **B:** Características após análise do iniciador anti- senso (5'-CTGAATGCCATCTTCTCTTAGTCCTC-3'), cuja posição no genoma é de 286-311. Os iniciadores foram desenhados tendo como base a referência o RNAm da glutamino sintetase da amostra AF004351.1 depositada no GenBank.

20

5.4 Padronização da reação quantitativa em cadeia da polimerase (qPCR)

5.4.1 Variação das concentrações dos iniciadores para a região 5'UTR.

Após testes feitos com os iniciadores para a região 5'UTR de DENV na PCR e antes de dar continuidade aos testes na PCR quantitativa, foi analisada a concentração ideal de uso dos iniciadores neste método.

A reação foi feita com a uma pré mistura contendo 2 μ L de tampão 10X, 2,0mM de MgCl₂, 1 μ L de Eva GreenTM (Biotium, Hayward, CA) 20X, 0,2 μ L de *Rox reference dye* 50X e água para uma concentração 2X. Foi usado 10 μ L da pré mistura, além de 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 2 μ L de amostra, água estéril para completar o volume da reação (20 μ L) e as seguintes concentrações teste dos iniciadores específicos: 25nM; 37,5nM; 50nM ; 62,5nM; 125nM; 250nM; 500nM; 1000nM.

15

Foi feita uma diluição dos iniciadores de 10 pmol/ μ L (10 μ M) para 1pmol/ μ L (1 μ M), com o intuito de facilitar a pipetagem dos volumes dos iniciadores usados para cada concentração testada: 25nM (2 μ L); 37,5nM (3 μ L); 50nM (4 μ L); 62,5nM (5 μ L); 125nM (10 μ L); 250nM (20 μ L); 500nM (40 μ L); 1000nM (80 μ L). Como controle positivo da reação foi usado o plasmídeo pGEMT-5'UTR (8 ng/ μ L) e água estéril como controle negativo. Ambos foram feitos em duplicata (FIGURA 18).

20

Após análise dos dados dos gráficos de amplificação foi observado uma diferença de 22 ciclos entre a concentração de 25nM (Ct= 28) e a de 1000nM (Ct= 6). Todavia, a amplificação do controle negativo das concentrações, aumentou na mesma proporção: CN-25nM (sem amplificação); CN-37,5nM (sem amplificação); CN-50nM (Ct= 42); CN-62,5 (Ct= 35); CN-125nM (Ct= 31); CN-250nM (Ct= 29); CN-500nM (Ct= 25); CN-1000nM (Ct= 27). Exceto o controle negativo, da concentração de 62,5nM, os demais controles negativos apresentaram uma amplificação inespecífica.

30

Dessa forma, foi observado que quanto maior a concentração dos iniciadores numa reação, menor o tempo de amplificação das amostras positivas e maior o número de amplificações inespecíficas, como a formação de dímeros de

iniciadores, vistos nos controles negativos das reações com maior concentração do iniciador.

5 Foi verificado também que a amplificação do controle negativo da concentração de 62,5 nM e de 125 nM foram resultado de uma possível contaminação com o controle positivo, pois as temperaturas de dissociação foram as mesmas (83,03°C).

10 Assim, apesar das reações com iniciadores mais concentrados apresentarem uma amplificação em ciclos precoces da PCR, foi verificado que as reações com iniciadores com concentrações de 50nM e de 62,5nM foram capazes de amplificar as amostras positivas em ciclos distintos da amplificação do controle negativo.

15

20

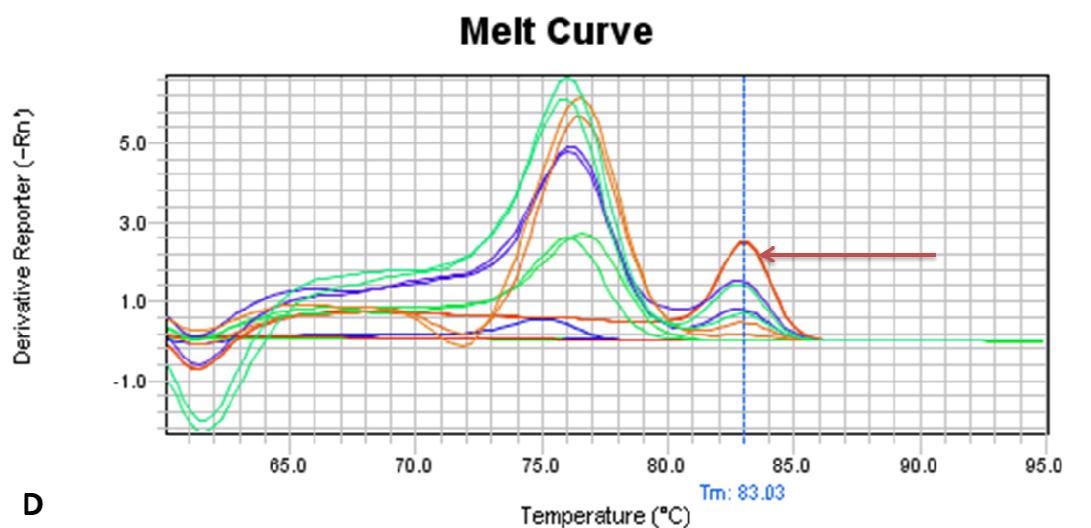
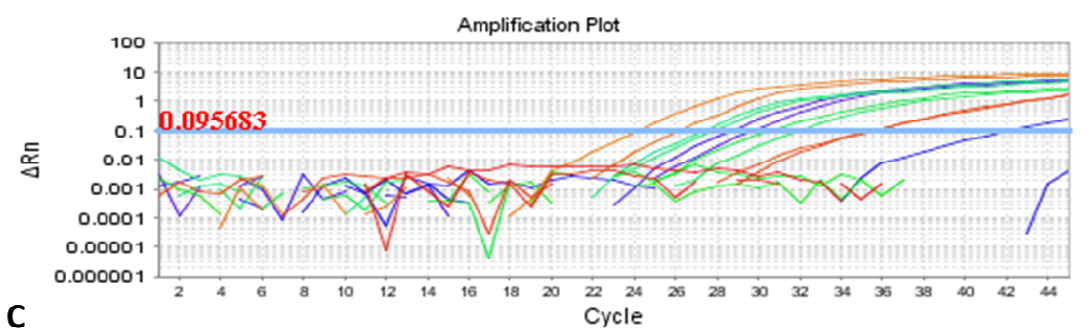
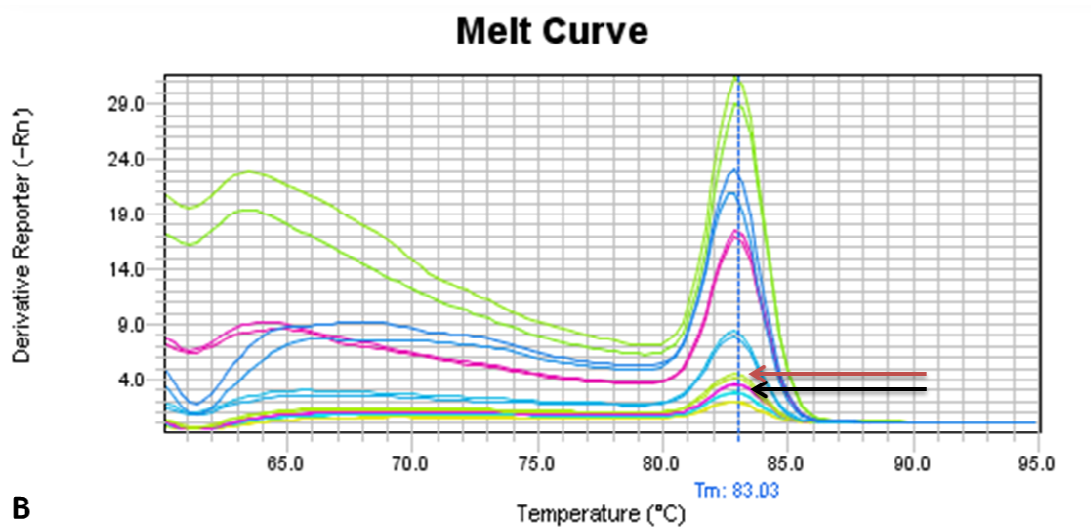
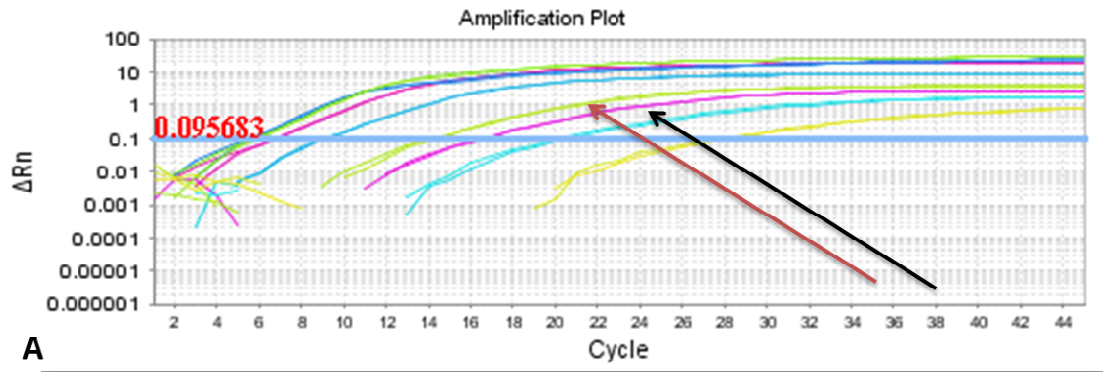


FIGURA 18: Teste de concentração ideal dos iniciadores na PCR quantitativa. A reação, com diversas concentrações dos iniciadores 5'UTR de DENV, foi feita para verificar a sensibilidade de amplificação do controle positivo e análise do controle negativo. A análise foi feita pela média do Ct de

5 cada concentração e pela temperatura de dissociação do controle positivo (pGEMT-5'UTR) e do controle negativo (água estéril), após 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 15 segundos, além da temperatura de dissociação. **A:** refere-se a curva de amplificação dos controles positivos de todas as concentrações testadas: 25nM (Ct= 27,9); 37,5nM (Ct=

10 20,3); 50nM (Ct= 16,4); 62,5nM (Ct= 14,2); 125nM (Ct= 9,1); 250nM (Ct= 6,7); 500nM (Ct= 5,9); 1000nM (Ct= 5,7). A seta preta inidica a curva de amplificação com o iniciador a 50nM e a seta vermelha a amplificação com os iniciadores a 62,5nM. **B:** é o gráfico com as temperaturas de dissociação de todas as concentrações. A seta preta inidica a curva de dissociação com o

15 iniciador a 50nM e a seta vermelha a curva com os iniciadores a 62,5nM. **C:** refere-se a curva de amplificação de todos os controles negativos (água estéril) de todas as concentrações testadas e a **D:** é o gráfico com as temperaturas de dissociação de todos os controles negativos. A seta em vermelho mostra a

20 curva de dissociação do iniciador a 62,5nM, com a mesma temperatura de dissociação do controle positivo.

25

30

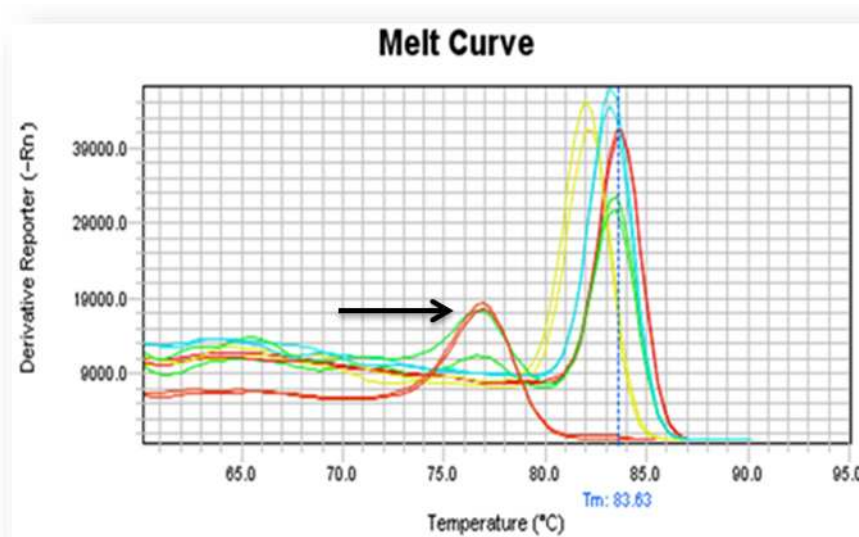
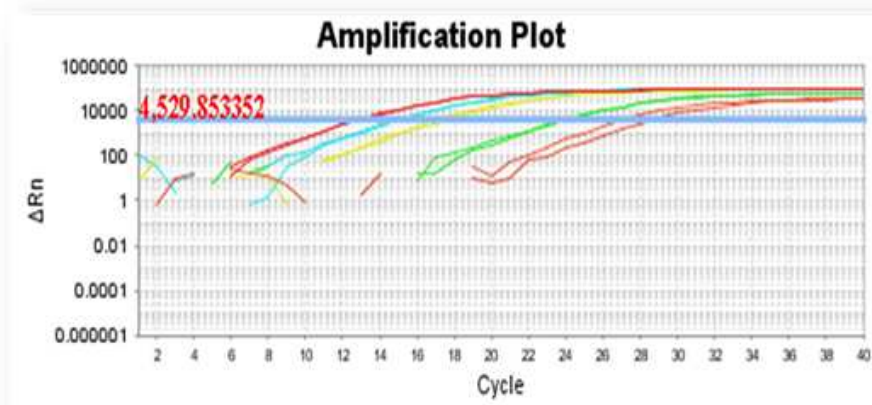
5.4.2 Detecção dos vírus por PCR quantitativo empregando iniciadores para a região 5'UTR do DENV

5 Dando continuidade aos testes dos iniciadores específicos para a região 5'UTR do *Dengue virus*, foi feita uma PCR quantitativa em que foram testados os cDNA de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 sintetizados com os iniciadores específicos a esta região e transcritos pela enzima M-MLV RT (Promega Corporation-EUA) (FIGURA 19).

10 Esta reação foi preparada com mistura composta de 2µL de tampão 10X, 2,0mM de MgCl₂, 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 10pmol dos iniciadores específicos, 1µL do corante Eva GreenTM(Biotium, Hayward, CA) 20X, 2µL de amostra e água estéril para completar o volume para 20µL de reação que foi feita no
15 termociclador *StepOne*[®] da AppliedBiosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*[®] versão 2.1 da AppliedBiosystems.

20 Nesta reação não houve diluição do cDNA das amostras e foi usado água estéril com controle negativo.

Após observação e análise dos dados emitidos nos gráficos foi observado que os iniciadores específicos para a região 5'UTR foram capazes de amplificar e de detectar a temperatura de dissociação de cada sorotipo. A amplificação do
25 controle negativo ocorreu em ciclos mais tardios quando comparados com os das amostras e sua temperatura de dissociação foi aproximadamente 7°C abaixo das temperaturas das amostras.



5

- 10 **FIGURA 19: Análise da amplificação empregando os iniciadores 5'UTR dos 4 sorotipos do DENV.** Para testar a eficiência dos iniciadores específicos para a região 5'UTR na PCR em tempo real, foi usado, em duplicata, o cDNA de DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 como molde e água como controle negativo. A reação foi realizada sob 45 ciclos, com a temperatura de pareamento a 60°C. De acordo com o gráfico de amplificação gerado, a média dos ciclos de amplificação, que ultrapassou o threshold (Ct), correspondentes a cada amostra foi: DENV-1 (ciclo 13); DENV-2 (ciclo 17,5); DENV-3 (ciclo 24,2); DENV-4 (ciclo 15,2); controle negativo (ciclo 28). O gráfico de dissociação da temperatura forneceu as seguintes temperaturas: DENV-1 (83,6°C); DENV-2 (82,1°C); DENV-3 (83,3°C); DENV-4 (83,1°C); Controle negativo (76,9°C).
- 15
- 20

5.4.3 Avaliação da eficiência da PCR quantitativa

Com o intuito de padronizar uma PCR quantitativa foi feito, em outros estudos do Laboratório de Vírus, uma mistura produzida no Laboratório que pudesse substituir o Master Mix comercial (SYBR Green[®] PCR Master Mix, Applied Biosystems). As concentrações salinas e enzimáticas foram mantidas nas seguintes condições: 2 μ L de tampão 10X, 2,0mM de MgCl₂, 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 10pmol dos iniciadores específicos, 1 μ L do corante Eva Green[™](Biotium, Hayward, CA) 20X, 2 μ L de amostra, água estéril para completar o volume para 20 μ L de reação e, em alguns reações foram adicionados o Rox reference dye 50X, como referência passiva.

Uma vez estabelecida as condições dos reagentes que compõem a mistura, foi feito o teste em algumas reações, principalmente com as de montagem da curva padrão (FIGURA 20-A)

A cada reação testada era preparado uma nova mistura e, isto contribuiu com o surgimento de variáveis entre as reações, causadas possivelmente pelos erros de pipetagem entre os reagentes do mix. Por este motivo, foi feito um estoque, com tampão 10x, 2,0mM de MgCl₂, Eva Green[™] (Biotium, Hayward, CA) 20X, 0,2 μ L de *Rox reference dye* 50X e água para uma concentração 2X. Estes reagentes eram usados em várias reações que, ao preparo de cada uma acrescentava além deste estoque 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 10pmol dos iniciadores específicos, 2 μ L de amostras e água para completar o volume para 20 μ L (FIGURA 20-B).

As reações eram feitas, em grande parte, em triplicata e, após calcular o volume da mistura, tendo como base 20 μ L/poço, a distribuição era feita da seguinte maneira: em um dos poços foi pipetado o volume de 54 μ L de mistura com 6 μ L de amostra, correspondente a 2 μ L por poço, homogeneizava-se o volume total e distribuía 20 μ L para cada poço da triplicata.

Os resultados observados após o preparo das reações usando uma pré mistura contribuíram bastante com a melhora dos resultados e manteve os valores mais constantes entre as reações. Além disso, houve o aumento da eficiência da reação e a melhora do valor de R^2 , fatores que determinam a qualidade e

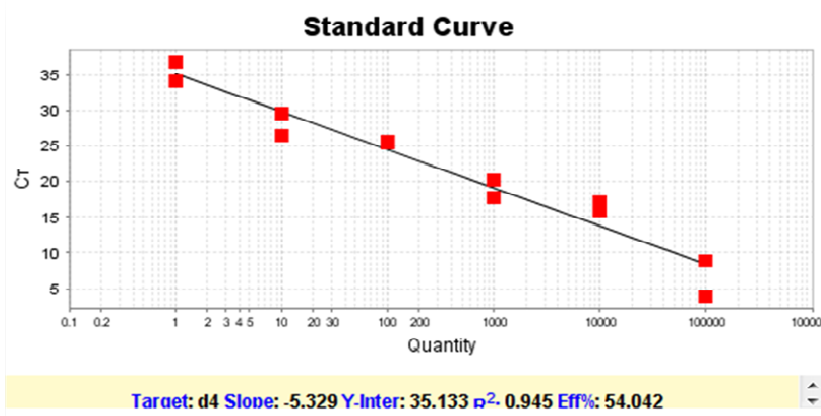
5 confiança do teste.

10

15

20

A



B

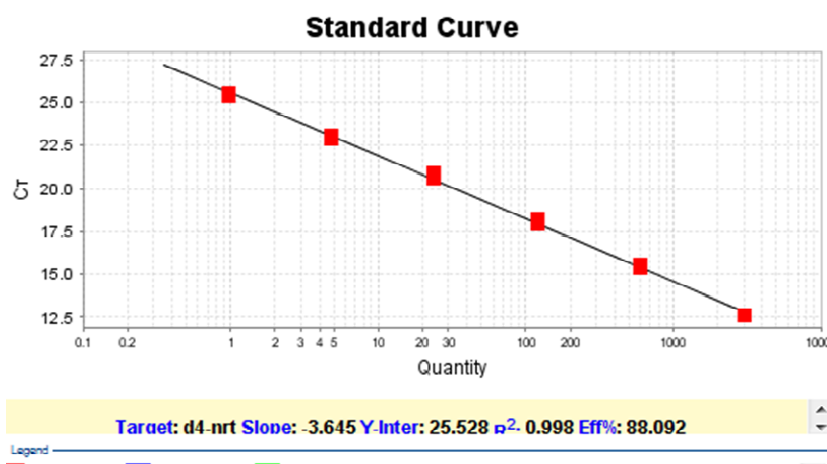


FIGURA 20: Eficiência da qPCR durante a montagem da curva padrão. A PCR quantitativa foi feita com os iniciadores específicos da região 5'UTR do DENV e como teste foram empregadas as diluições do pGEMT-5'UTR correspondentes a 10^8 e 10^4 cópias de DNA plasmidial. A reação foi feita no termociclador *StepOne*[®] da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*[®] versão 2.1 da AppliedBiosystems. **A:** curva padrão com reação feita sem o uso da mistura estoque (pré mistura). **B:** curva padrão preparada com o uso da pré mistura, dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), *Taq* DNA polimerase, iniciadores específicos e água.

5.4.4 Eficiência da PCR quantitativa usando cDNA sintetizado com diferentes iniciadores.

Seguindo com os testes feitos na PCR quantitativa, foi feita uma reação para saber qual o melhor resultado de amplificação do cDNA quando este é sintetizado por diferentes iniciadores: um produzido com iniciadores específicos para a região 5'UTR, que geram cDNA a partir de uma região conhecida do genoma do *Dengue virus* e o outro por iniciadores randômicos que são hexâmeros que possuem baixa especificidade e produzem cDNA de origem variada.

Foram usados para este teste o cDNA do DENV-1 e de pools de larvas de *Aedes sp* e água estéril como controle negativo da reação. A concentração correspondente a cada iniciador testado foi: 0,5 µg/µL do iniciador randômico e 10 pmol do iniciador 5'UTR do DENV, ambos usados no volume de 5 µL.

As condições térmicas usadas na síntese do cDNA foram as seguintes: uma incubação do RNA com o iniciador a 70°C por 5 minutos, seguida de um banho de gelo e do acréscimo dos demais reagentes: RT-PCR 5X (Tris a 250mM pH 8.9, MgCl₂ a 15mM, KCl a 375mM, DTT a 50mM), 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 200U M-MLV RT (Promega Corporation-EUA), 20U de RNAsin (Ribonuclease Inhibitor-Promega).

As reações feitas com os iniciadores randômicos foram a 37°C por 60 minutos. Nas reações feitas com os iniciadores específicos para a região 5'UTR foram feitas a 42°C. Nos dois casos houve uma extensão a 72°C por 10 minutos.

Dando continuidade ao teste, 2 µL de cada cDNA gerado foi amplificado na PCR em tempo real usando a pré mistura produzida no Laboratório, 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 10pmol dos iniciadores específicos e água estéril para completar o volume da reação. A reação foi feita em duplicata e foi usada água como controle negativo (FIGURA 21).

Após observações feitas nos gráficos de amplificação e de dissociação foi verificado que o cDNA sintetizado pelos iniciadores randômicos apresentam uma amplificação mais tardia que o cDNA amplificado com os iniciadores específicos para a região 5'UTR.

5

Os resultados obtidos pelos gráficos de dissociação demonstram que, em alguns casos há o surgimento de vários picos de temperaturas quando é uma amplificação proveniente de um cDNA gerado com iniciadores randômicos, o que pode dificultar a análise dos resultados.

10

15

20

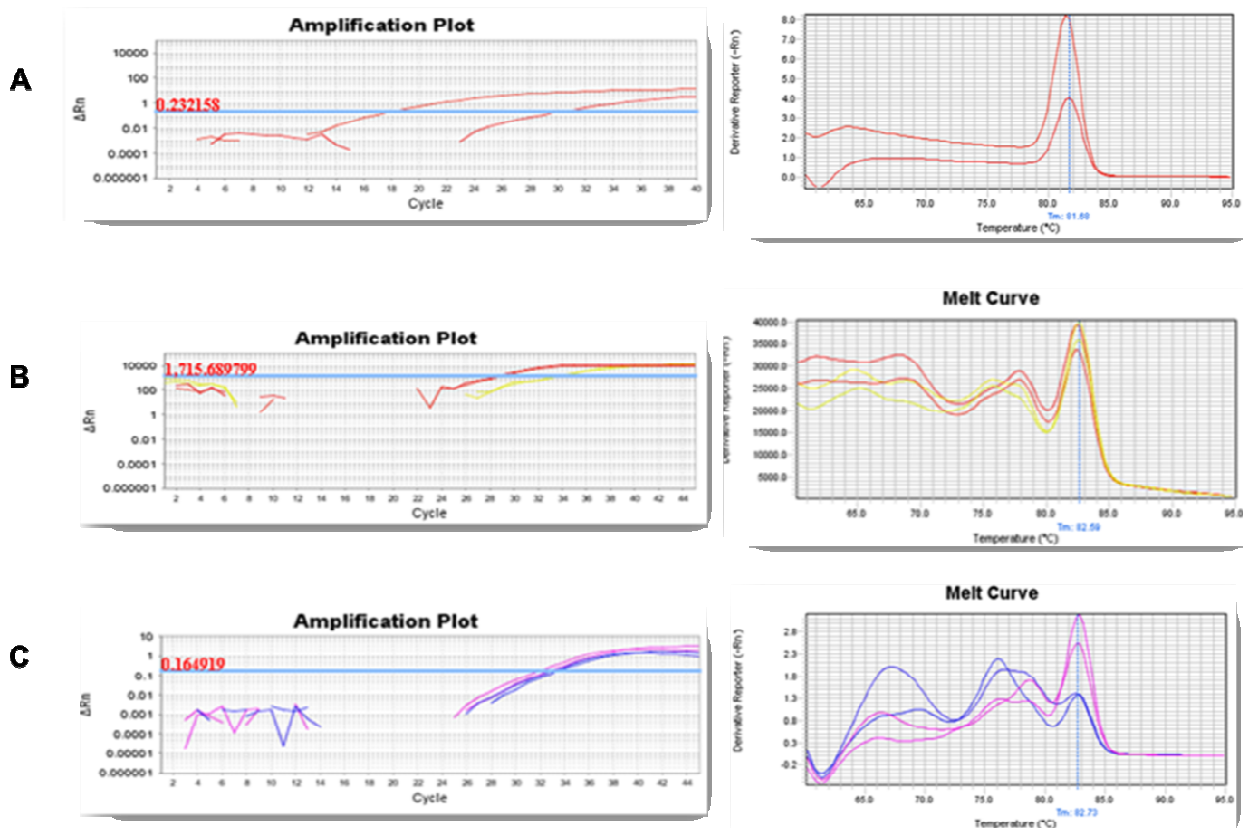


FIGURA 21: Ciclos de amplificação e temperatura de dissociação de cDNA gerados com iniciadores randômicos e 5'UTR de DENV. Foi feito um teste na reação de transcrição reversa usando iniciadores específicos para a região 5'UTR e iniciadores randômicos. O produto dessa reação foi usado como molde na PCR quantitativa com 45 ciclos e uma curva de dissociação de temperatura. **A:** mostra que o DENV-1, que teve o cDNA gerado por iniciadores randômicos, teve sua amplificação no ciclo 18, enquanto o DENV-1 com o cDNA gerado com iniciadores randômicos amplificou a partir do ciclo 30. Essa diferença também pode ser visualizada na curva de dissociação. **B:** é uma reação sem o Rox (referência passiva) na mistura produzida no Laboratório. A amostra usada foi um "pool" de larva positivo para DENV e a diferença de amplificação é de: Ct= 28 para cDNA gerado com iniciador específico e Ct= 34 para cDNA gerado com iniciador randômico. **C:** reação em que foi testado outro "pool" de larva, também positiva para DENV, cuja amplificação do cDNA gerado com iniciadores randômicos acontece em ciclos mais tardios (Ct=35) comparado com o cDNA gerado com o específico (Ct=32). Apesar da diferença de amplificação entre as amostras dessa reação ser bem pequena, a curva de dissociação demonstra vários picos de temperatura inespecíficos do cDNA gerado com iniciador randômico.

5.4.5 Qualidade da amplificação do DNA após diluição do cDNA em PCR quantitativo.

5 Com o objetivo de verificar a ocorrência de inibidores na amostra, como o DTT (ditioteitol), um agente que protege as pontes dissulfídicas do RNA da oxidação, e que é na maioria dos casos adicionado em reações enzimáticas, como a RT-PCR 5X (Tris a 250mM pH 8.9, MgCl₂ a 15mM, KCl a 375mM, DTT a 50mM) da M-MLV RT (Promega Corporation-EUA), foi feito um teste de diluição do cDNA na PCR quantitativa (DEPREZ *et al.*, 2002).
10

Para este teste foi usado cDNA de “pools” de larvas e de DENV-4 diluídos em água, e feitos em duplicata, na razão: 1:5; 1:10; 1:20 e 1:40. Para a PCR quantitativa foi usada a pré mistura acrescida de 10mM dos nucleotídeos
15 (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 10pmol dos iniciadores específicos e água para completar o volume para 20 µL. Foi usada água estéril como controle negativo da reação (FIGURA 22).

Ao analisar a média dos Ct das duplicatas de cada diluição pode-se observar
20 uma diferença de 2 ciclos de amplificação de uma diluição a outra, no caso da reação feita com o cDNA de DENV-4. No caso da reação feita com cDNA de larvas foi observado também uma diferença dos Ct das diluições próximas a dois ciclos, o que não é confirmado apenas no caso da diluição 1:40 deste cDNA. O que provavelmente indica um erro no preparo das diluições.

25 Outra observação é que os ciclos de amplificações das reações feitas com cDNA de larvas inicia em tempos mais tardios que o próprio controle negativo (água estéril) da reação. Sendo assim, as diluições feitas no cDNA, com o intuito de diminuir a ação de inibidores no fluoróforo da reação, neste caso, não
30 foi válido para as amostras de larvas.

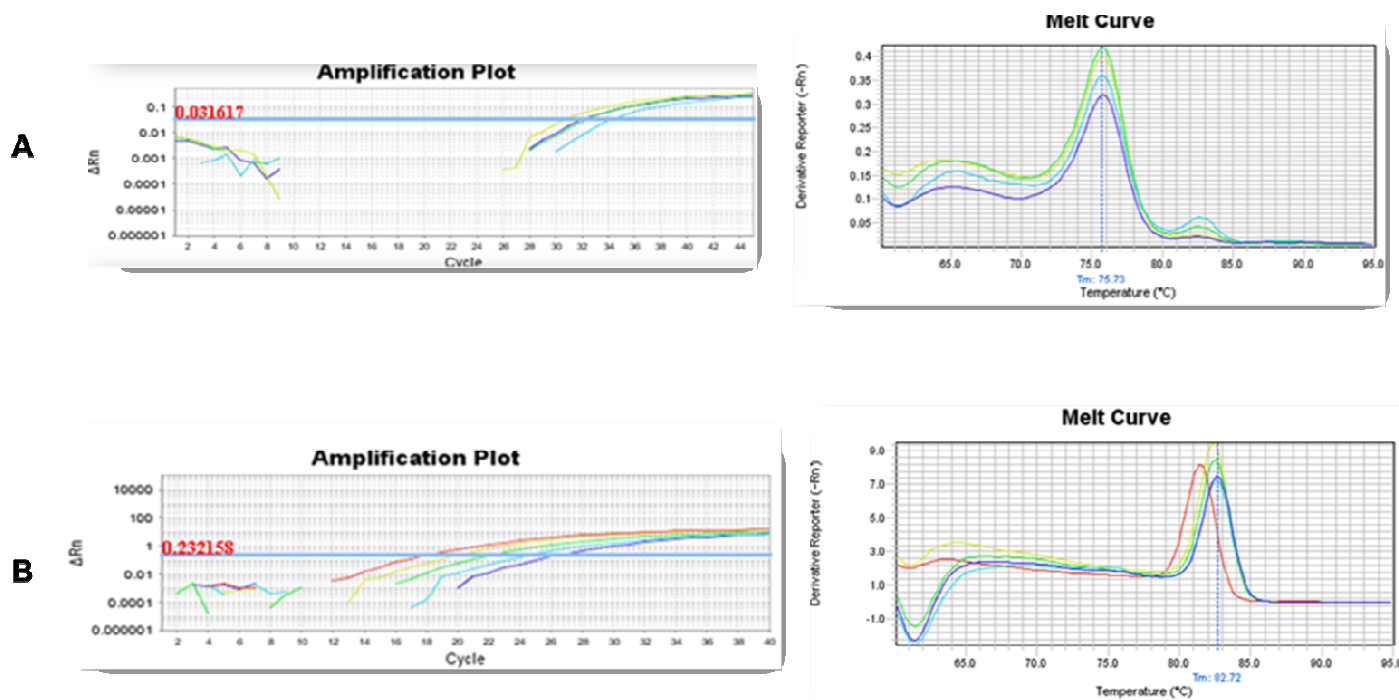


FIGURA 22: Análise da qualidade da amplificação da PCR em tempo real.

Amostras de cDNA de DENV-4 e de “pools” de larvas diluídas em água, foram submetidas a PCR quantitativa para verificar a qualidade da amplificação e diminuição de ruídos de fluorescências causados por agentes inibitórios. **A:** mostra as diluições do cDNA de um “pool” de larvas de *Aedes sp* negativa para DENV. As diluições correspondem aos seguintes Ct: 1:5 (Ct= 30,6; 1:10 (Ct= 32,2); 1:20 (Ct=34,2); 1:40 (Ct= 32), controle negativo (Ct= 29,8). No gráfico de dissociação da temperatura essa diluição é evidente. **B:** mostra as diluições do cDNA do DENV-4 e a média do Ct é de: sem diluir: (Ct=18); 1:5 (Ct=20); 1:10 (Ct=22,3); 1:20 (Ct=24,8); 1:40 (Ct=26,7); controle negativo (Ct=38,3). O gráfico de dissociação mostra também que essa diferença na diluição influi nas temperaturas, tendo a amostra de cDNA não diluída um valor de 81,46°C e as diluídas um valor de 82,4°C.

5.4.6 Teste da amplificação dos iniciadores normalizadores da PCR quantitativa em pools de larvas e mosquito de *Aedes sp*

Baseado em estudos feitos com iniciadores específicos ao gene da glutaminosintetase de *Aedes sp* (SMARTT, *et al.*, 1998), foram sintetizados iniciadores que pudessem amplificar apenas o RNAm desta região e que funcionassem como normalizadores em uma PCR quantitativa. E para dar continuidade aos testes com estes iniciadores, cDNA de pools com 10 e 15 larvas e um pool com 5 mosquitos, todos de *Aedes aegypti*, sintetizados pelo iniciador anti senso específico, foram submetidos a primeira PCR quantitativa para a detecção do gene da glutaminosintetase. Um total de nove “pools” de larvas de *Aedes sp*, coletados em campo, também foram submetidas a PCR quantitativa para detecção e amplificação do gene da glutaminosintetase, cujo cDNA também foi gerado pelo iniciador anti senso específico. Foi usada água como controle negativo da reação de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 67°C por 15 segundos, além da curva de dissociação de temperatura (FIGURA 23 e FIGURA 24).

Na primeira reação teste, pode-se verificar uma diferença de temperatura de dissociação entre os “pools” de larvas (76,9°C) e o “pool” de mosquito (77,7°C), além do valor da média do Ct: “pool” de mosquito (Ct= 30,6); “pool” com 10 larvas (Ct= 35,2); “pool” com 15 larvas (Ct= 35,7), o que pode está relacionado com a quantidade de material a ser amplificado, que é maior em mosquitos do que nas larvas.

Dos nove “pools” de larvas testadas, somente um apresentava uma única larva de *A.albopictus* e os demais 50 larvas de *A.aegypti*. Exceto um pool, os demais amplificaram a glutamino sintetase. A temperatura de dissociação de seis “pools” de larvas foi de 76,88°C e as demais uma temperatura média de 77,5°C.

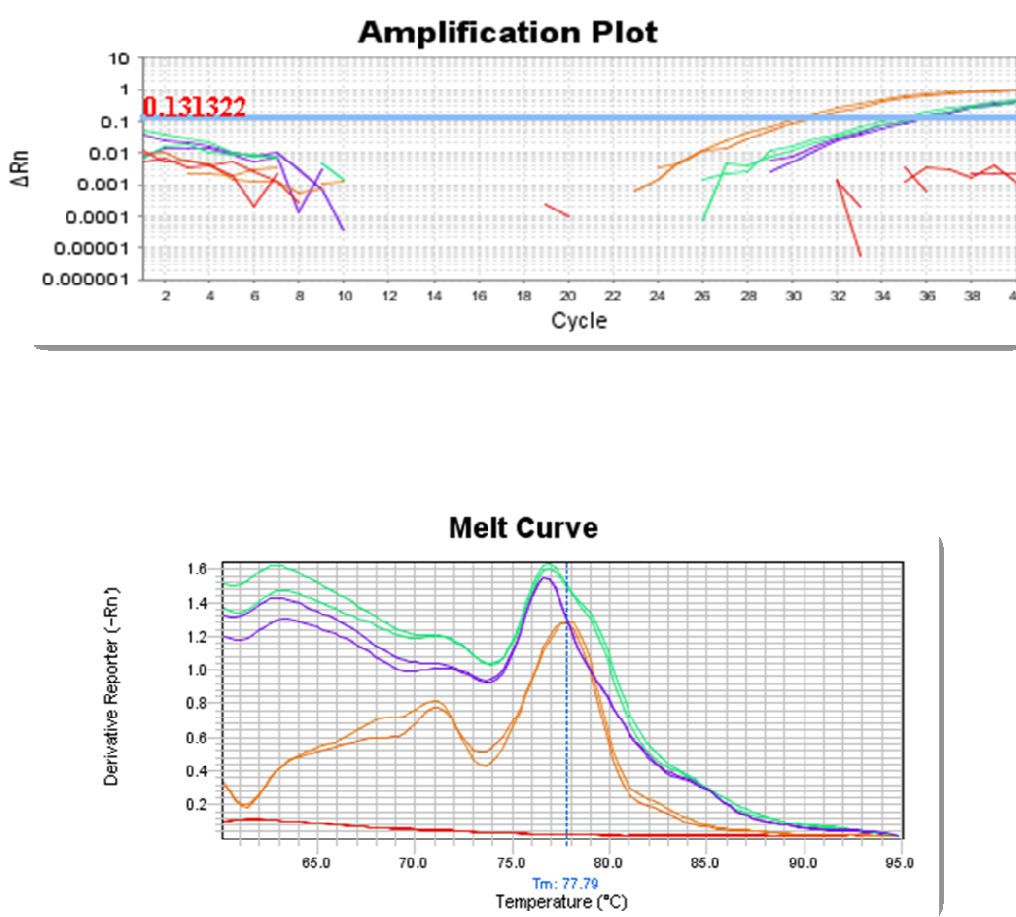


FIGURA 23: Avaliação da amplificação do gene da glutamino sintetase de *Aedes sp* empregando iniciadores normalizadores específicos. Os cDNA, gerado pelo iniciador anti senso específico, de “pools” de larvas e de mosquito de *Aedes sp*, foi amplificado pelos iniciadores específicos ao gene da glutamino sintetase, numa PCR quantitativa, de 40 ciclos e feita com a pré mistura produzida no Laboratório. O gráfico de amplificação mostra o valor médio de Ct do “pool” de mosquito (30,6), o do “pool” com 15 larvas (35,2) e o do “pool” com 10 larvas (35,7). O gráfico de dissociação da temperatura mostra um valor de 77,79°C para o “pool” de mosquito e uma temperatura de 76,9°C para os “pools” de mosquito. Não houve amplificação do controle negativo.

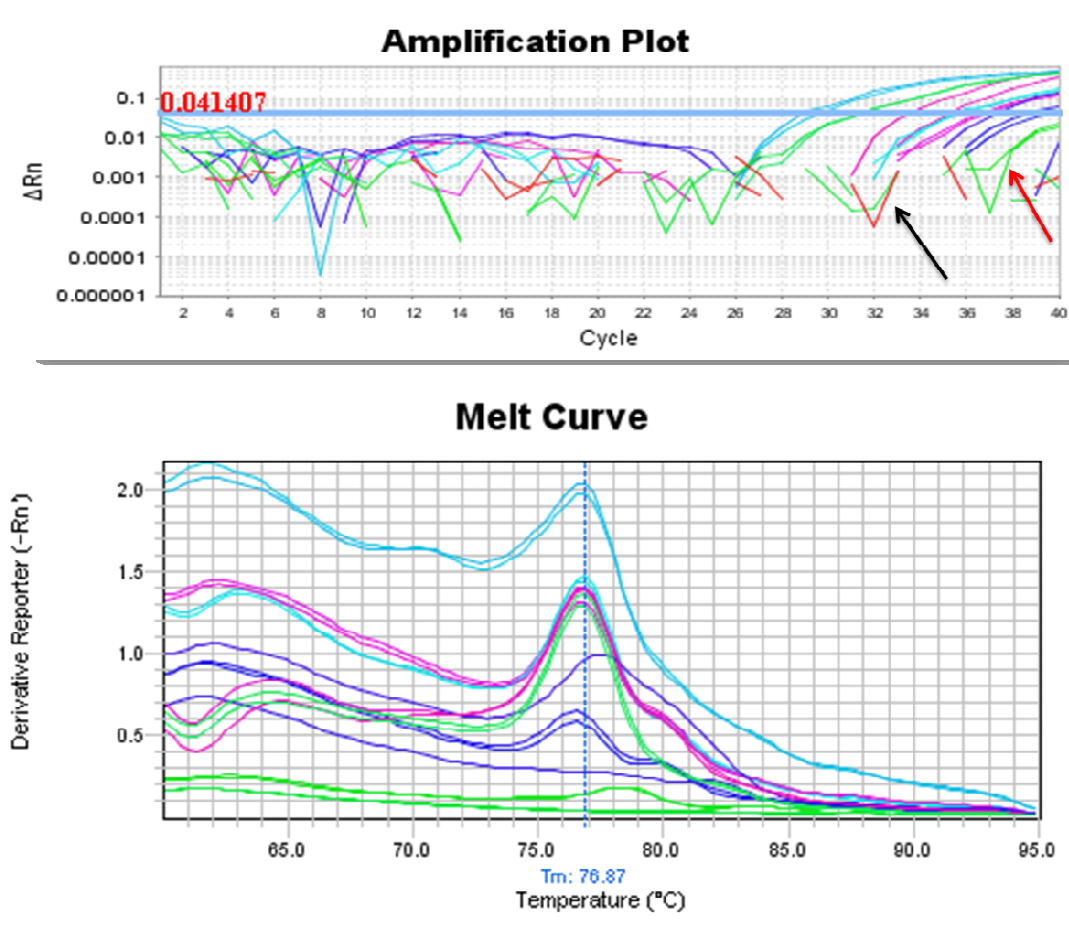


FIGURA 24: Amplificação do gene da glutamino sintetase em “pools” com diferentes quantidade de larvas de *Aedes sp.* PCR quantitativa feita com a pré mistura produzida no Laboratório, em 40 ciclos com cDNA, gerados pelo iniciador anti senso específico, de “pools” de larvas. O gráfico de amplificação mostra os valores de Ct de cada amostra testada, o controle negativo (água estéril) indicado pela seta preta e, indicado pela seta vermelha a amplificação da larva de *A.albopictus*. O gráfico de temperatura de dissociação dos nove “pools” de larvas de *Aedes sp.*

5.4.7 Análise quantitativa do número de cópias do genoma do DENV em “pools” de larvas de *Aedes sp.*

5.4.7.1 Construção da curva padrão

5 Após a construção do plasmídeo pGEMT- 5´UTR e testes em PCR, foi feito a conversão da concentração total para número de cópias de DNA plasmidial, que corresponde a $3,5 \times 10^{-18}$ g por cópia, cálculo este obtido com a seguinte fórmula: multiplicação do DNA total (plasmídeo e inserto) em pb por $1,096 \times 10^{21}$ g/pb (APPLIED BIOSYSTEMS). Sendo assim, 90 ng de pGEMT- 5´UTR
10 corresponde a $2,5 \times 10^{10}$ cópias.

Em seguida ao cálculo de conversão para números de cópias, foram feitas diluições deste DNA plasmidial, na base 10, para obter os números de 10^6 até 10 cópias de pGEMT- 5´UTR. Estes 6 pontos foram usados no preparo da
15 curva padrão da PCR quantitativa que foi feita com a pré mistura, 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 10pmol dos iniciadores específicos, água estéril para completar o volume para 20µL de reação e 2µL de cada diluição do plasmídeo. A reação foi feita sob 40 ciclos, uma curva de melting, tendo água como controle negativo da reação
20 que foi feita em triplicata (FIGURA 25).

Em paralelo, foi feita a mesma reação usando o Master Mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems), 10pmol dos iniciadores específicos, água estéril para completar o volume para 18µL de reação e 2µL
25 de cada diluição do plasmídeo com as seguintes condições de temperatura: uma desnaturação a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (FIGURA 26).

Foi possível observar que a diferença do valor de Ct na reação feita com os
30 reagentes preparados no Laboratório foi bastante variável quando comparada com os valores da reação feita com os reagentes comerciais, que apresentou uma diferença próxima a três ciclos de uma diluição a outra. Além disso, o controle negativo da reação Master Mix comercial não apresentou nenhuma amplificação enquanto o controle negativo da outra reação apresentou uma

amplificação inespecífica no ciclo 33, o que aproxima bastante dos Ct das amostras da curva padrão.

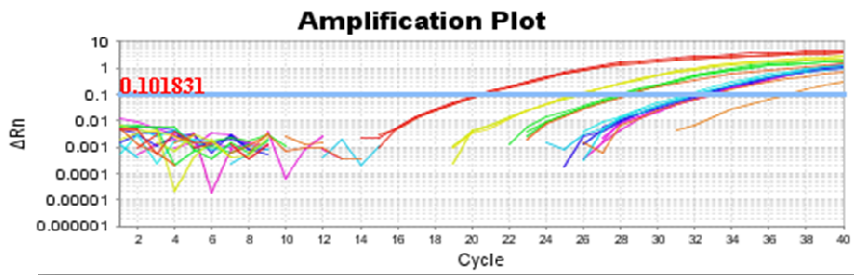
5 Com relação ao gráfico de dissociação dos números de cópias de DNA plasmidial, ambas as reações foram capazes de amplificar e reconhecer com a mesma temperatura todas as diluições.

10 Outra observação interessante é que as diluições correspondentes aos números de 10^3 a 10 cópias da reação feita com reagentes produzidos no Laboratório apresentam mais de um pico de temperatura, sendo um de $82,59^\circ\text{C}$ e o outro compatível com a temperatura do controle negativo (76°C). As diluições da reação feita com a mistura de reagente comercial apresentaram um único pico de temperatura ($79,04^\circ\text{C}$), que é diferente em aproximadamente 3°C da reação feita com a *Taq* DNA polimerase.

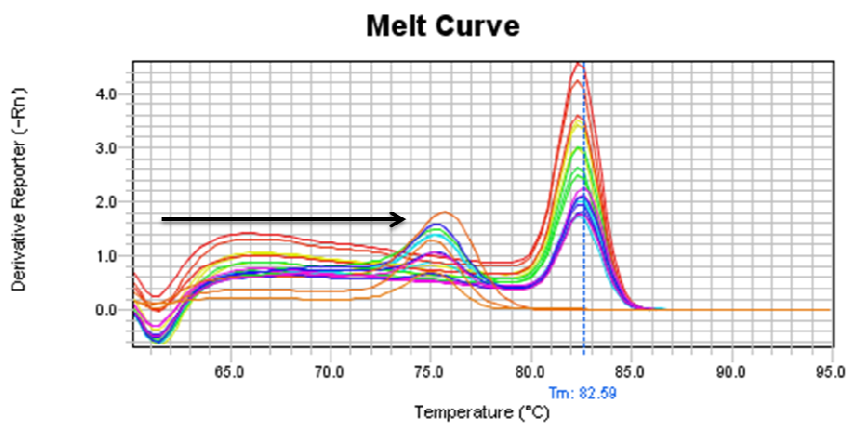
15

A curva padrão da reação apresentou um valor de R^2 de 0,89 provavelmente porque a diluição de 10 cópias de DNA iniciou sua amplificação praticamente no mesmo ciclo da diluição de 10^2 cópias. Isto, aliado às amplificações inespecíficas, contribuiu para uma eficiência acima de 100% (158%) e afetou o valor do coeficiente de regressão (-2,429). A eficiência da curva padrão com reagentes comerciais foi de 124% o que, apesar de não ter ocorrido amplificações inespecíficas, pode ser reflexo das variações dos Ct das diluições. Da mesma forma, a diluição com 10 cópias de DNA amplificou em ciclos anteriores ao de 10^2 cópias, e isto favoreceu uma curva com pontos não
25 totalmente alinhados, conferindo ao R^2 um valor de 0,89 e um *slope* de -2,84.

30

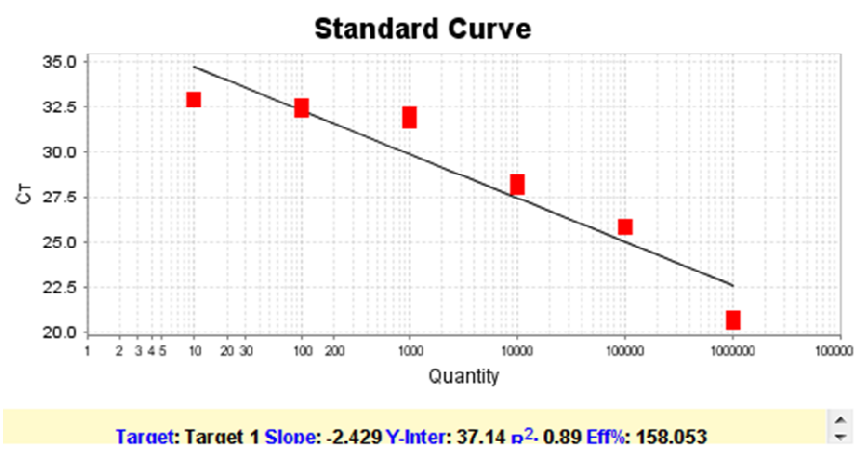


5



10

15

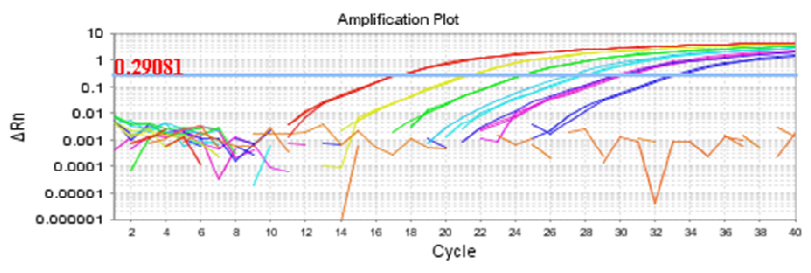


20

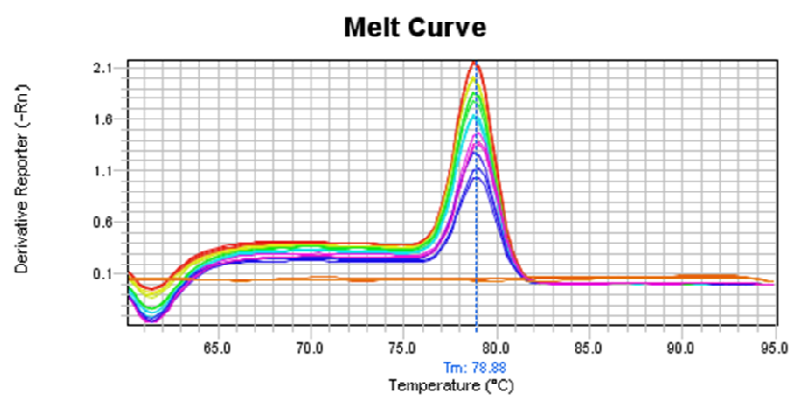
25 **FIGURA 25: Teste de sensibilidade da curva padrão construída com reagentes produzidos no Laboratório.** A qPCR usou de iniciadores 5'UTR de DENV e reagentes produzidos no Laboratório com 40 ciclos de amplificação. O gráfico de amplificação mostra uma média do valor de Ct: 10^6 (Ct= 20,3); 10^5 (Ct= 25,6); 10^4 (Ct=27,9); 10^3 (31,7); 10^2 (Ct=32,1); 10 (Ct= 32,7); controle negativo (Ct= 32,8). O gráfico de dissociação da temperatura conferiu um valor de 82,59°C em todas as diluições e outra de aproximadamente 76°C para as diluições de 10^3 a 10 cópias e para o controle negativo (indicado pela seta).

30

5

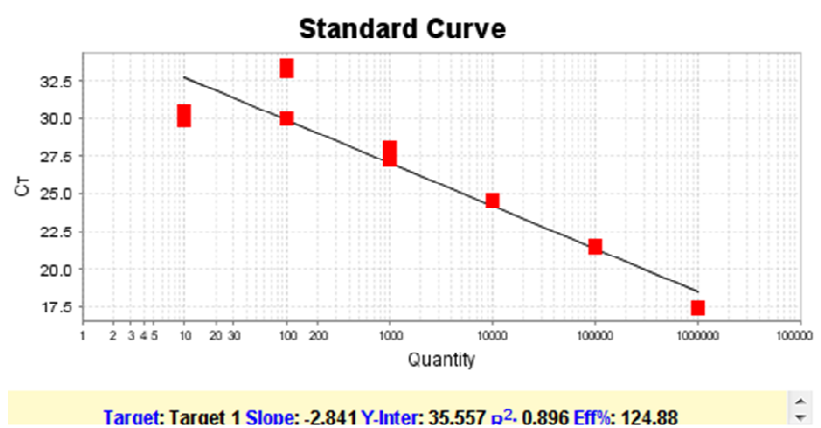


10



15

20



25

30

FIGURA 26: Teste de sensibilidade da curva padrão construída com o Master Mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems). Após a conversão do DNA plasmidial para número de cópias, foi preparada uma PCR quantitativa usando iniciadores específicos para a região 5'UTR e reagentes produzidos no Laboratório com 40 ciclos de amplificação. O gráfico de amplificação mostra uma média do valor de Ct: 10^6 (Ct= 15,6); 10^5 (Ct= 19,7); 10^4 (Ct=22,8); 10^3 (25,9); 10^2 (Ct=30,3); 10 (Ct= 28,3); controle negativo (não teve amplificação). O gráfico de dissociação da temperatura conferiu um valor de 78,8°C em todas as diluições.

5.4.7.2 Detecção de número de cópias de genoma de DENV nos “pools” de larvas de *Aedes sp* coletadas na cidade de Belo Horizonte

Antes de construir a curva padrão com 10^6 a 10^4 cópias de DNA plasmidial, foram feitos PCR quantitativos com curvas de 10^8 a 10^4 cópias com o intuito de testar algumas amostras de “pools” de larvas de *Aedes sp*. Estas reações foram feitas com a pré mistura composta por reagentes produzidos no Laboratório, 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 10pmol dos iniciadores específicos para a região 5'UTR, água estéril para completar o volume para 20 μ L de reação e 2 μ L de amostra. Essas reações foram feitas com 45 ciclos e tinham como controle negativo água estéril.

Das primeiras amostras amplificadas com os “pools” de larvas do mês de junho-semana 2, apenas 3 foram verdadeiramente positivas quando a análise é feita pela observação da temperatura de dissociação ser igual ao controle positivo (82,74°C) e por estarem as quantificações dentro do limite da curva padrão. Contudo, esta observação perde um pouco a credibilidade quando é comparado o Ct dessas amostras com a média do controle negativo da reação (FIGURA 27). Outra qPCR foi feita para terminar as análises dos “pools” de larvas do mês de junho-semana 2. Foi verificado que houve mais de uma temperatura de dissociação para cada um deles. Uma era correspondia ao controle positivo (82,59°C) e a outra (75,87°C) ao controle negativo da reação (água estéril) (FIGURA 28). Os demais “pools” foram analisados em outra qPCR e apresentaram uma curva de dissociação com uma única temperatura que corresponde a do controle positivo (82°C), com exceção de dois “pools” que apresentaram duas temperaturas de dissociação, sendo uma compatível com a do controle positivo e a outra com a do controle negativo (FIGURA 29).

A quantificação feita de cada “pool” ficou, na maioria das reações, enquadrada fora dos pontos de confiança da curva, apesar dessa ser construída com 10^4 cópias como o valor mínimo. Todavia, ao analisar o valor médio das triplicatas das amostras dos pools de larvas verifica-se que as mesmas ocorrem em ciclos mais tardios e muito próximos do controle negativo.

Devido a problemas de sensibilidade das reações feitas com reagentes produzidos no Laboratório e com a dificuldade em quantificar o DNA de DENV, em números de cópias, nos pools de larvas, foi preparado algumas PCR quantitativas com o objetivo apenas de verificar a existência de DENV nestas amostras através da temperatura de dissociação.

Os resultados da amplificação dos “pools” de larvas do mês de outubro-semana 1, testadas com iniciadores 5´UTR de DENV, apresentaram uma média de Ct (aproximadamente 25) maior que do controle negativo (Ct= 21). Os oito “pools” de *A.aegypti* apresentaram duas temperaturas de dissociação e (FIGURA 30).

Uma qPCR, também feita para detectar DENV, testou 12 “pools” de *A.aegypti*, coletados no mês de dezembro-semana 3. Todos os “pools” apresentaram duas temperaturas na curva de dissociação, sendo uma correspondente ao controle positivo e a outra ao controle negativo (FIGURA 31).

Alguns “pools” de larvas do mês de junho-semana 1, também foram analisadas quanto a presença de DENV. Dos cinco “pools” testados, somente 1 apresentou uma temperatura correspondente ao controle positivo, tendo os demais dois picos na curva de dissociação da temperatura (FIGURA 32).

Os resultados obtidos nas reações de detecção de DENV em “pools” de larvas de *Aedes sp* demonstrou a existência de mais de uma temperatura de dissociação, além das amplificações acontecerem praticamente no final da reação e, em alguns casos, após a amplificação do controle negativo.

Mesmo não sendo possível realizar a quantificação nos pools de larvas foi feito um registro das amostras que apresentaram a amplificação do DNA de DENV (TABELA 4).

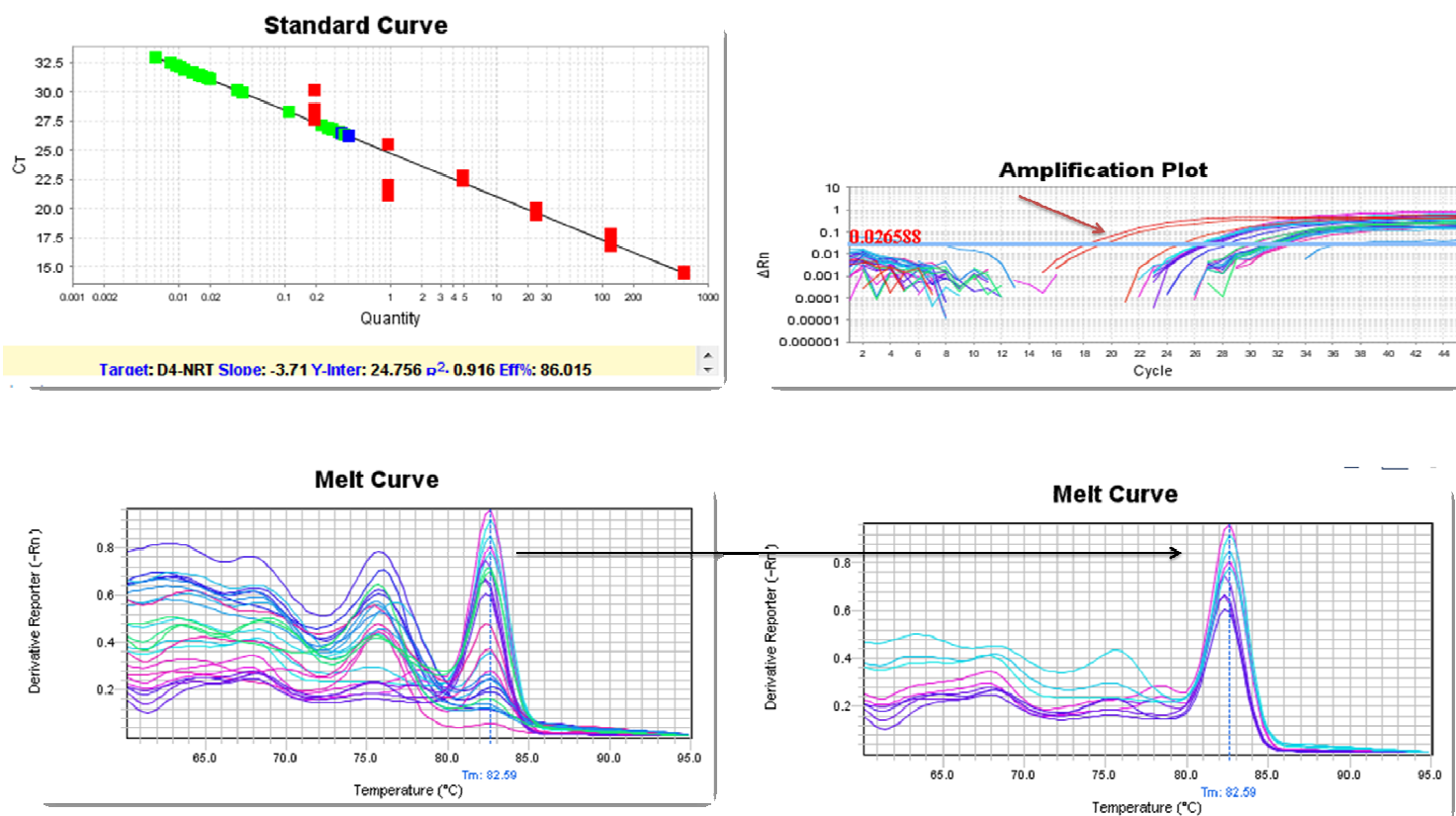


FIGURA 27: Análise quantitativa de cópias de DENV em 8 “pools” de larvas coletadas no mês de junho-semana 2. A qPCR foi feita com os iniciadores 5’UTR de DENV, usando a pré mistura produzida no Laboratório. A reação foi feita com 45 ciclos, com uma curva padrão construída com 10^8 a 10^4 cópias de DNA plasmidial e cDNA de 8 “pools” de larvas de *Aedes sp.* A reação foi feita no termociclador *StepOne*[®] da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*[®] versão 2.1 da AppliedBiosystems. O gráfico de amplificação mostra que a média do Ct do controle negativo (água estéril) foi de 20 enquanto a média do Ct dos “pools” das larvas foi de aproximadamente 28, indicado pela seta vermelha, no gráfico. A curva padrão gerou um R^2 de 0,96, uma eficiência de 86% e um *slope* de -3,71. O gráfico de dissociação de temperatura mostrou dois picos para a maioria dos “pools”, tendo apenas três “pools” uma única temperatura compatível com o controle positivo (indicado pela seta preta). Esses “pools” apresentaram uma quantificação dentro dos limites da curva.

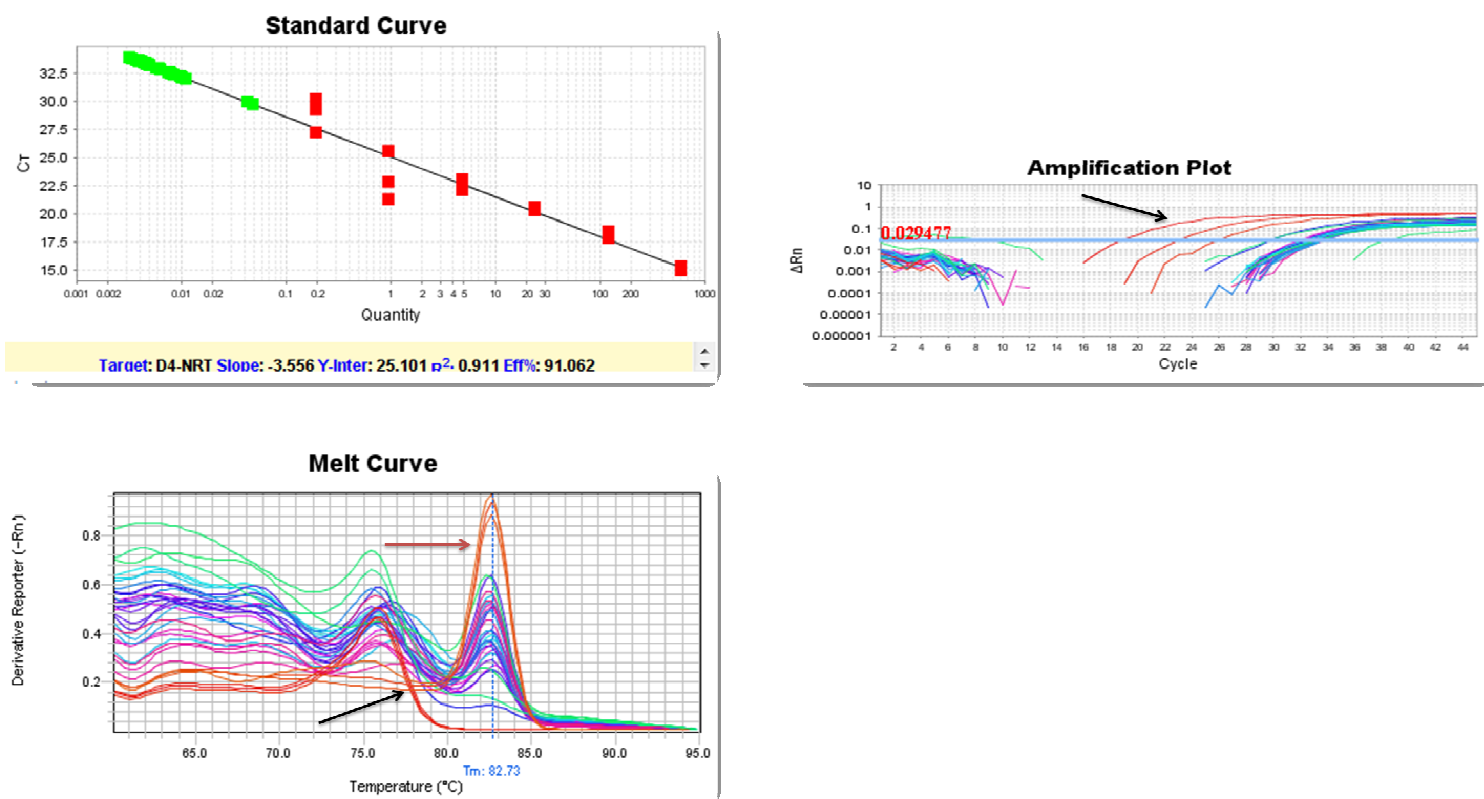


FIGURA 28: Análise quantitativa de cópias de DENV em 9 “pools” de larvas coletadas no mês de junho-semana 2. A qPCR foi feita com os iniciadores 5’UTR de DENV, usando a pré mistura produzida no Laboratório. A reação foi feita com 45 ciclos, com uma curva padrão construída com 10^8 a 10^4 cópias de DNA plasmidial e cDNA de 9 “pools” de larvas de *Aedes sp.* A reação foi feita no termociclador *StepOne*[®] da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*[®] versão 2.1 da Applied Biosystems. O gráfico de amplificação mostra que a média do Ct do controle negativo (água estéril) foi de 22 enquanto a média do Ct dos pools das larvas foi de aproximadamente 32, indicado pela seta preta. A curva padrão gerou um R² de 0,911, uma eficiência de 91% e um *slope* de -3,556. Nenhum dos “pools” de larvas testados apresentou uma quantificação dentro dos limites da curva. O gráfico de dissociação de temperatura mostrou dois picos para todos os “pools”, sendo a temperatura do controle negativo mostrado pela seta preta e a do controle positivo pela seta vermelha.

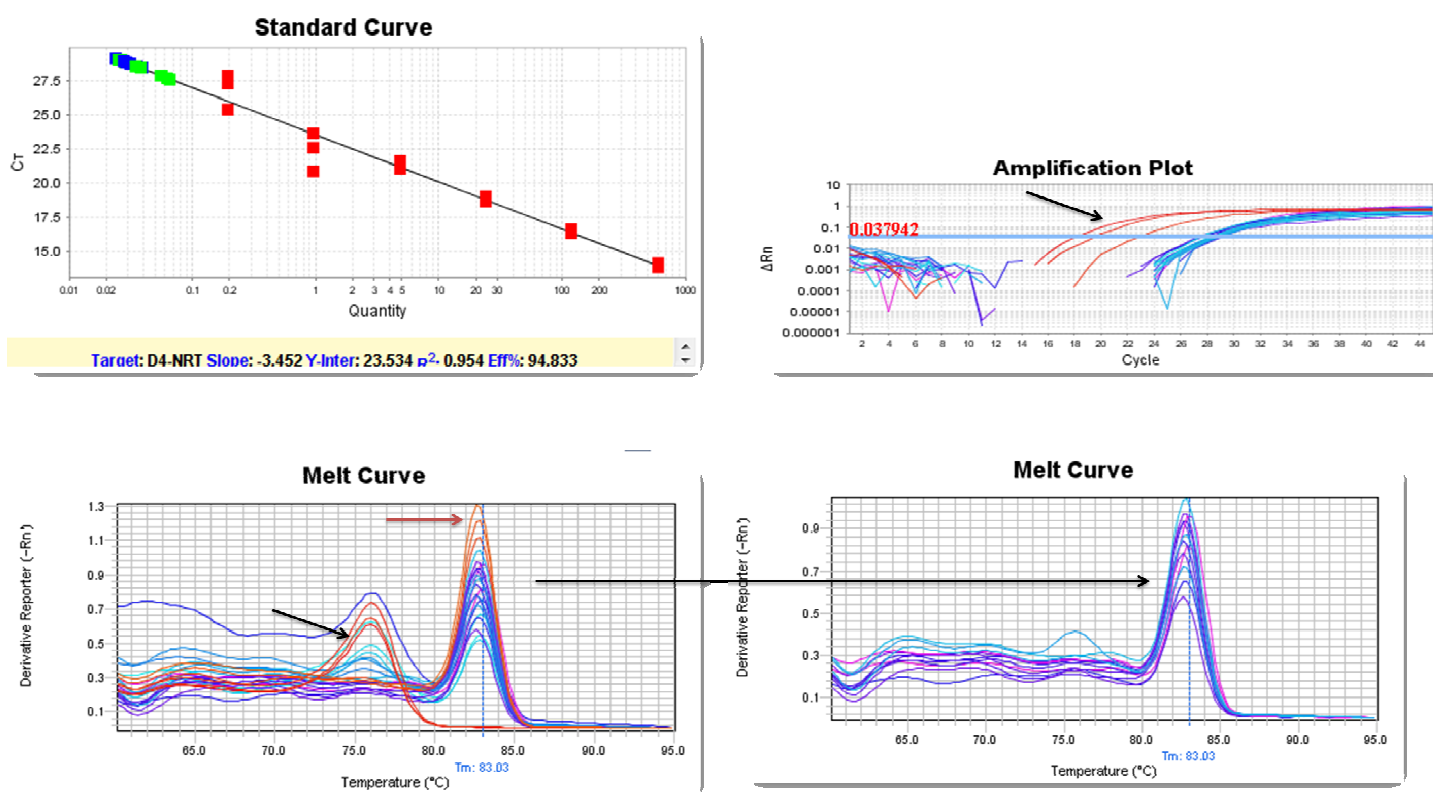


FIGURA 29: Análise quantitativa de cópias de DENV em 6 “pools” de larvas coletadas no mês de junho-semana 2. A qPCR foi feita com os iniciadores 5’UTR de DENV, usando a pré mistura produzida no Laboratório. A reação foi feita com 45 ciclos, com uma curva padrão construída com 10^8 a 10^4 cópias de DNA plasmidial e cDNA de 6 “pools” de larvas de *Aedes sp.* A reação foi feita no termociclador *StepOne*[®] da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*[®] versão 2.1 da Applied Biosystems. O gráfico de amplificação mostra que a média do Ct do controle negativo (água estéril) foi de 22 (indicado pela seta preta), enquanto a média do Ct dos pools das larvas foi de aproximadamente 28. A curva padrão gerou um R² de 0,954, uma eficiência de 94% e um *slope* de -3,452. Nenhuma das amostras de pools de larvas testados apresentou uma quantificação dentro dos limites da curva. Exceto dois “pools”, os demais apresentaram um único pico de temperatura, como indicado pela seta preta. O pico da temperatura, no gráfico de dissociação, do controle positivo está mostrado pela seta vermelha e do controle negativo pela seta preta.

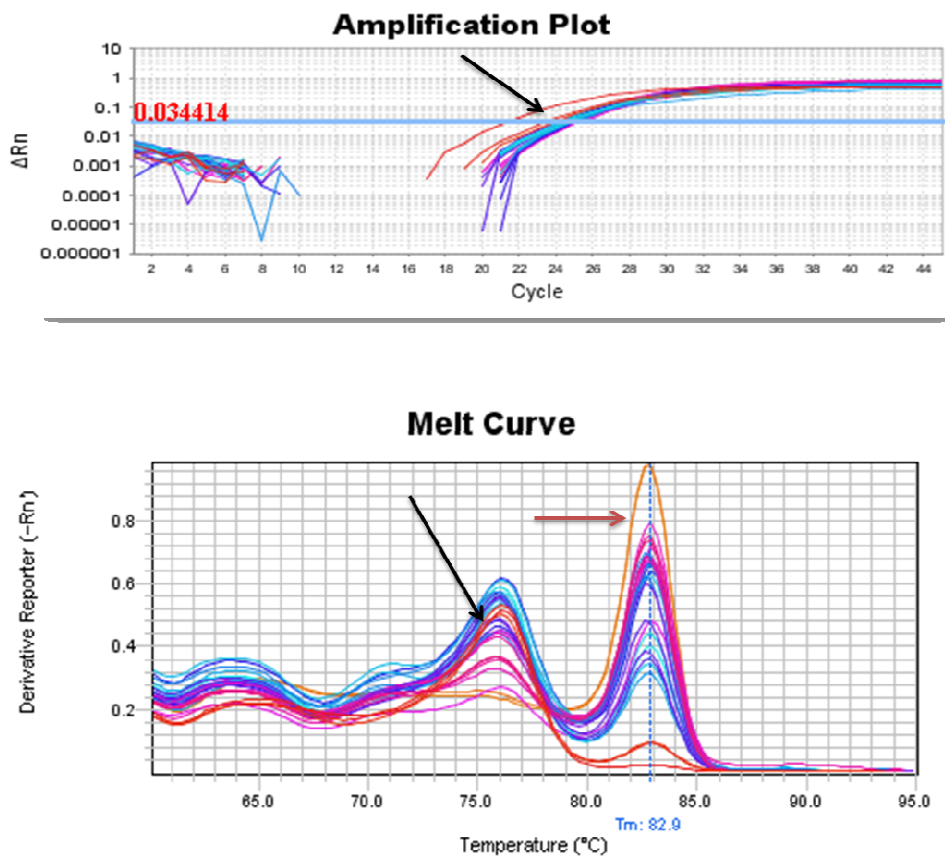


FIGURA 30: Detecção de DENV em 8 “pools” de larvas coletadas no mês de outubro-semana 1. A qPCR foi feita com os iniciadores 5’UTR de DENV, usando a pré mistura produzida no Laboratório. A reação foi feita com 45

5 ciclos, com uma curva padrão construída com 10^8 a 10^4 cópias de DNA plasmidial e cDNA de 6 “pools” de larvas de *Aedes sp.* A reação foi feita no termociclador *StepOne*[®] da Applied Biosystems e os dados de detecção e

10 quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*[®] versão 2.1 da Applied Biosystems. O gráfico de amplificação mostra que a média do Ct do controle negativo (água estéril) foi de 23 (indicado pela seta preta), do controle

positivo (10^6 cópias de pGEMT-5’UTR) foi de 17, enquanto a média do Ct dos “pools” das larvas foi de aproximadamente 25. O gráfico de dissociação mostra o pico correspondente ao controle negativo (indicado pela seta preta), o pico da

15 temperatura do controle positivo (indicado pela seta vermelha) e o pico dos “pools” de larvas, compatíveis aos controles da reação.

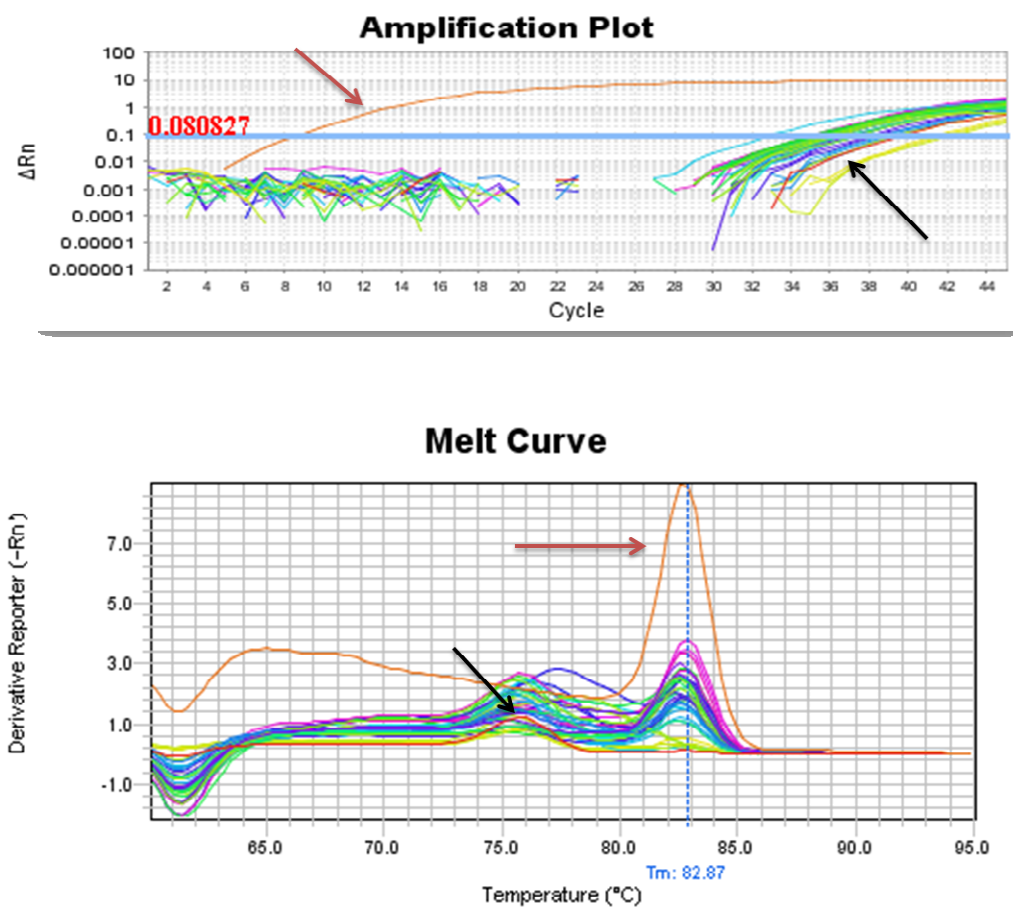


FIGURA 31: Detecção de DENV em 12 “pools” de larvas coletadas no mês de dezembro-semana 3. A qPCR foi feita com os iniciadores 5’UTR de DENV, usando a pré mistura produzida no Laboratório. A reação foi feita com 45 ciclos, com uma curva padrão construída com 10^8 a 10^4 cópias de DNA plasmidial e cDNA de 6 “pools” de larvas de *Aedes sp.* A reação foi feita no termociclador *StepOne*[®] da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*[®] versão 2.1 da Applied Biosystems. O gráfico de amplificação mostra que a média do Ct do controle negativo (água estéril) foi de 40 (indicado pela seta preta), do controle positivo (10^9 cópias de pGEMT-5’UTR) foi de 9 (indicado pela seta vermelha), enquanto o Ct dos “pools” das larvas foi entre 35 e 41. Na curva de dissociação, a seta preta mostra o pico do controle negativo e a seta vermelha o pico do controle positivo.

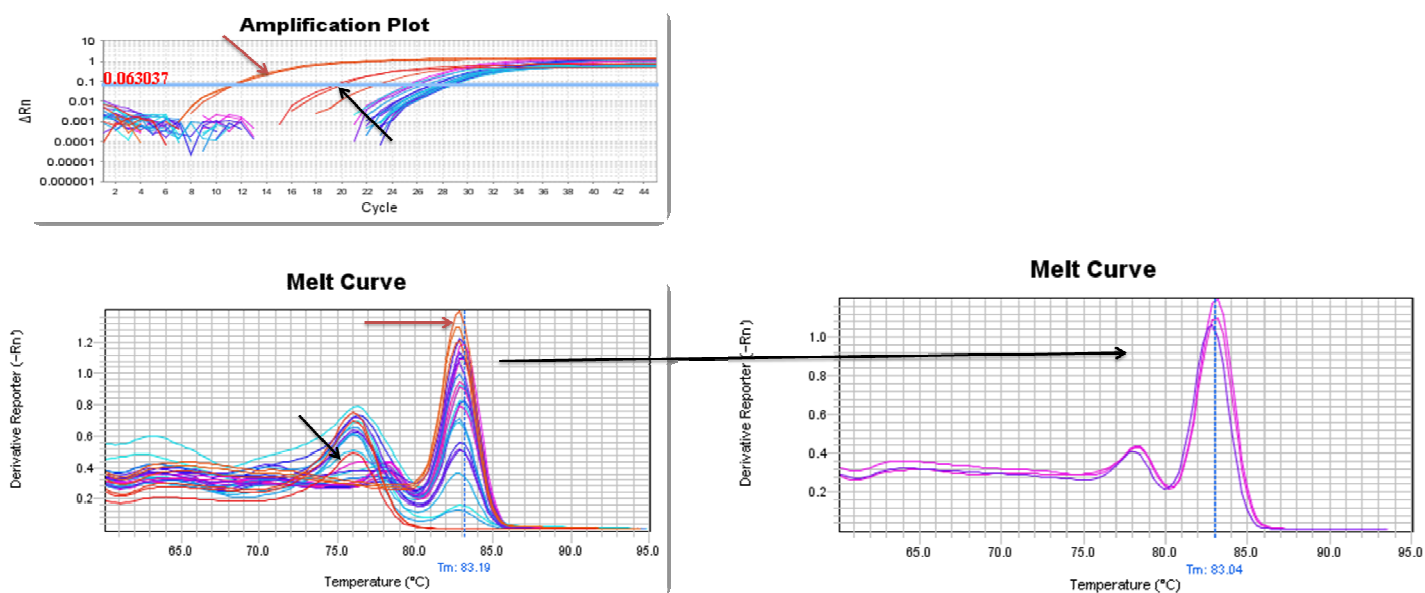


FIGURA 32: Detecção de DENV em 7 “pools” de larvas coletadas no mês de junho-semana 1. A qPCR foi feita com os iniciadores 5’UTR de DENV, usando a pré mistura produzida no Laboratório. A reação foi feita com 45 ciclos, com uma curva padrão construída com 10^8 a 10^4 cópias de DNA plasmidial e cDNA de 6 “pools” de larvas de *Aedes sp.* A reação foi feita no termociclador *StepOne*[®] da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*[®] versão 2.1 da Applied Biosystems. O gráfico de amplificação mostra que a média do Ct do controle negativo (água estéril) foi de 21 (indicado pela seta preta), a média do Ct do controle positivo foi de 11 (indicado pela seta vermelha), enquanto o Ct dos “pools” das larvas foi 27. A curva de dissociação mostra o pico correspondente ao controle negativo (indicado pela preta) e do controle positivo (indicado pela seta vermelha). O pico da temperatura, compatível com o controle positivo, de um “pool” de larva está indicado pela seta preta.

TABELA 4: Análise da presença de genoma de DENV nos “pools” de larvas de *Aedes sp* coletados em campo

Mês da coleta	Nome do “pool”	Forma de coleta no campo	Regional de Belo Horizonte	Identificação	Quantidade por pool	Deteção do DENV em PCR*	Deteção do DENV em qPCR (Tm°C)**
Junho-semana 1	1	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50	P	P
Junho-semana 1	2	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50	N	-
Junho-semana 1	3	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50	P	-
Junho-semana 1	4	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50	P	-
Junho-semana 1	5	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50	N	-
Junho-semana 1	6	larva	Noroeste	<i>Aedes albopictus</i>	1	P	?
Junho-semana 1	7	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	50	P	P
Junho-semana 1	8	larva	Leste	<i>Aedes aegypti</i>	50	P	-
Junho-semana 1	9	larva	Centro-sul	<i>Aedes aegypti</i>	52	P	?
Junho-semana 1	10	larva	Pampulha	<i>Aedes aegypti</i>	15	P	?
Junho-semana 2	1	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	2	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	P
Junho-semana 2	3	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	P
Junho-semana 2	4	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	P
Junho-semana 2	5	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	P
Junho-semana 2	6	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	P
Junho-semana 2	7	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	8	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	P
Junho-semana 2	9	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	10	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	11	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	12	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	P
Junho-semana 2	13	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	P
Junho-semana 2	14	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	15	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	16	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	17	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	18	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	19	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	20	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	21	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	22	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	23	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	24	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	25	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	26	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?

Junho-semana 2	27	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	28	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	29	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Junho-semana 2	30	ovo	Barreiro	<i>Aedes sp</i>	-	-	?
Outubro-semana 1	1	larva	Leste	<i>Aedes aegypti</i>	8	N	?
Outubro-semana 1	2	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	10	N	?
Outubro-semana 1	3	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	8	N	?
Outubro-semana 1	4	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	5	N	?
Outubro-semana 1	5	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	6	N	?
Outubro-semana 1	6	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	9	N	?
Outubro-semana 1	7	larva	Oeste	<i>Aedes aegypti</i>	5	P	?
Outubro-semana 1	8	larva	Oeste	<i>Aedes aegypti</i>	7	P	?
Outubro-semana 1	9	larva	Oeste	<i>Aedes aegypti</i>	1	P	?
Dezembro-semana 3	1	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	15	-	?
Dezembro-semana 3	2	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	13	-	?
Dezembro-semana 3	3	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	14	-	?
Dezembro-semana 3	4	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	11	-	?
Dezembro-semana 3	5	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	10	-	?
Dezembro-semana 3	6	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	9	-	?
Dezembro-semana 3	7	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	5	-	?
Dezembro-semana 3	8	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	40	-	?
Dezembro-semana 3	9	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	3	-	?
Dezembro-semana 3	10	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	5	-	?
Dezembro-semana 3	11	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	12	-	?
Dezembro-semana 3	12	larva	Noroeste	<i>Aedes aegypti</i>	3	-	?

* Nas amostras com (-) não foi feito o PCR

** Nas amostras com (P) indica a amplificação do DNA de DENV na curva de dissociação. Nas amostras com (?) houve a presença de mais de uma temperatura de dissociação. As amostras com (-) não foi feito o qPCR.

5

10

15

20

VI. DISCUSSÃO

A dengue é considerada uma das arboviroses de maior impacto na saúde pública sendo registrados cerca de um milhão de casos anualmente (WHO). Cerca de 3,5 bilhões de pessoas, que vivem em países tropicais e subtropicais, estão em situação de risco de infecção com o DENV (HARIS, 2008). Este risco
5 é determinado pela exposição de um indivíduo ao mosquito vetor *Aedes sp*, que atualmente apresenta uma ampla distribuição geográfica (HALSTEAD, 2007).

Infecções com qualquer um dos 4 sorotipos do DENV podem resultar em duas
10 síndromes bem definidas: febre do dengue e febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue. A detecção do vírus fica mais complicada porque a viremia coincide com o período febril. Assim como a detecção de anticorpos, que em casos de infecção primária, inicia após o fim da circulação do vírus e do período de febre. A maioria dos testes sorológicos
15 comerciais apresentam resultados falso-positivos além da baixa sensibilidade. Por estes motivos que a maioria dos esforços, para obter resultados mais sensíveis e mais rápidos, está sendo na biologia molecular (HALSTEAD, 2007).

Por não existir vacina para a dengue, a prevenção e o controle dependem
20 principalmente de dados epidemiológicos, que forneçam estimativas de casos de dengue, e ajudam a implementar medidas de controle e erradicação do mosquito vetor. Isto faz com que seja cada vez mais necessário estudar a biologia do vetor e a sua densidade em uma determinada área para determinar a potencial transmissão do DENV. Aliado a isso, os estudos com mosquitos
25 coletados em campo ajudam a detectar qual o sorotipo circulante e a estabelecer medidas de controle no local do foco (JOHN, 2009).

Alguns estudos analisaram aspectos relacionados a capacidade e competência
vetorial do *Aedes sp* (BENNETT, *et al.*, 2002; HILL, *et al.*, 2008; RICHARDSON,
30 *et al.*, 2006), o que reforça ainda mais a necessidade de obter uma melhor compreensão sobre a biologia do vetor.

Há uma grande dificuldade em identificar a espécie de larvas *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, por serem as principais diferenças morfológicas com detalhes muito pequenos. Atualmente existem programas desenvolvidos para esta finalidade (IWERSEN, *et al.*, 2002). A dificuldade em diferenciar as duas espécies e a presença de larvas em outros estágios larvais, foram os motivos porque alguns “pools” não foi feita a identificação das larvas. HILL e colaboradores em 2008 também registraram a dificuldade em analisar as diferenças, entre as espécies, nas larvas com o estágio larval de L4.

10

Em uma qPCR o objetivo é quantificar o cDNA tendo como referência uma amostra padrão de concentração conhecida (LUTFALLA, *et al.*, 2006). Além de permitir que o produto da PCR possa ser coletado na fase linear, com essa técnica também é possível medir o número de ciclos necessários para detectar um sinal (ciclo threshold), conhecendo assim, a quantidade inicial da amostra testada. Com o uso de SYBR Green I, a emissão da fluorescência aumenta cerca de 100 vezes sempre que encontra com um material dupla fita (DEPREZ, *et al.*, 2001).

15

O preparo da qPCR, assim como a PCR, usou de misturas para o desenvolvimento da técnica. Diferente da maioria dos estudos com PCR quantitativos que usam kits comerciais (CHUTINIMITKUL, *et al.*, 2005; AQUINO *et al.*, 2008; CHAO, *et al.*, 2007; SHU, *et al.*, 2003), a metodologia empregada constou de concentrações de reagentes previamente testados e analisados em outros estudos do Laboratório de Vírus. Da mesma forma, LUTFALLA, *et al.*, 2006 propõem desenvolver uma mistura a ser empregada na metodologia da qPCR, por apresentar.

25

A metodologia teve como sistema de detecção o corante Eva GreenTM (Biotium, Hayward, CA), que representa uma nova geração de ligantes de DNA. Esse tipo de corante apresenta uma maior afinidade e uniformidade de ligação com o DNA dupla fita. Além disso, permite o uso de uma concentração mais elevada na reação, por possuir um menor nível de inibidores na PCR, quando

30

comparado com o SYBR Green I. Segundo LUTFALLA, et al., 2006, a concentração do SYBR Green I na reação tem que ser baixa para que não haja interferência na PCR. De maneira geral, um corante de DNA para qPCR apresenta duas características importantes: aumento da fluorescência quando
5 ligado ao DNA dupla fita e não provoca inibição considerável da PCR. As vantagens do corante incluem a possibilidade de ser utilizado para monitorar a amplificação de qualquer sequência de DNA dupla fita e sem o uso de sonda, o que reduz a configuração do ensaio e os custos de execução. A principal desvantagem do sistema de corante é a possibilidade de gerar sinais falso-positivos, já que a molécula de Eva GreenTM se liga a qualquer DNA dupla fita
10 (BIOTIUM, INC).

Um par de iniciadores é considerado aceitável quando é possível encontrar uma temperatura de pareamento capaz de amplificar o produto de interesse
15 (INVITROGEN). Os estudos feitos com o intuito de detectar genoma de DENV em amostras clínicas e em mosquitos utilizam iniciadores específicos para várias regiões do genoma. LAUE et al., 1999 e NAZE e colaboradores em 2009, desenvolveram iniciadores universais aos 4 sorotipos do DENV, e específicos a região 3' UTR, que junto com sondas TaqMan, detectaram o
20 vírus em amostras de pacientes. SHU e colaboradores em 2003, escolheram a região do capsídeo para detectar os 4 sorotipos do DENV, mesmo após análise de regiões do genoma como a NS3, NS5 e 3'UTR. Da mesma forma, WANG et al., 2000 e CHIEN *et al.*, 2006, optaram pela mesma região para detectar DENV em PCR quantitativo. Já CHAO et al., 2007, desenvolveram iniciadores
25 específicos ao pareamento da região NS5 do genoma do DENV para detectar oito vírus, do gênero *Flavivirus*, em mosquitos. Contudo, AQUINO et al., 2006 estudaram as sequências genômicas da região da proteína E e da 5'UTR, em DENV-3 circulantes em uma epidemia no Paraguai e Brasil, e desenvolveram iniciadores específicos para estas regiões. E em estudos posteriores, AQUINO
30 e colaboradores em 2008, desenvolveram uma qPCR com SYBR Green I para detectar DENV em amostras clínicas com o emprego de iniciadores específicos ao pareamento da região 5'UTR.

A escolha do iniciador para a região 5'UTR descrito por AQUINO *et al.*, 2006, foi por ser uma região ainda não descrita para a detecção de DENV em larvas de *Aedes sp.* Os produtos da PCR, usando vírus e "pools" de larvas, foi bastante específico, produzindo um amplificado de 148 pb, que foi observado tanto no fracionamento em gel de poliacrilamida 8% quanto em agarose 1% (FIGURAS 12 e 15). Análises dos iniciadores no programa OligoCalc revelaram que a temperatura ideal de pareamento estaria entre 50°C e 55°C. Isso pode explicar a boa amplificação das reações feitas em temperaturas entre 47°C e 60°C, observadas na reação de teste de temperatura ideal feito em gradiente (FIGURA 14).

Ao testar os iniciadores específicos para a região 5'UTR do DENV, na PCR quantitativa, foi verificada uma especificidade da amplificação dos mesmos quando utilizados os cDNA dos 4 sorotipos do DENV em qPCR (FIGURA 19) Apesar da região 5'UTR apresentar estruturas secundárias, o pareamento dos iniciadores foi possível e permissível ao desenvolvimento da reação (AQUINO *et al.*, 2008).

A maioria das amostras amplificadas em qPCR, usando iniciadores específicos para a região 5'UTR, apresentaram mais de um pico correspondente a temperatura de dissociação (FIGURA 25, 27 e 28). Os picos que correspondiam, em valor de T_m °C, ao controle negativo da reação, podem provavelmente ser resultado de dímeros de iniciador (DEPREZ, *et al.*, 2001). Contudo, isso poderia ser melhor analisado aplicando o produto dessa reação em gel de agarose, pois a existência de dímeros pode ser um dos indícios da presença de bandas difusas e com manchas entre os produtos fracionados. A presença de dímeros numa reação só é considerável quando está presente em amostras controles, pois a ausência de amostras a ser amplificadas favorece o surgimento de dímeros (INVITROGEN).

30

Amplificações de produtos inespecíficos em amostras em teste são uma problemática, pois contribuem com o desvio da fluorescência e para um valor alterado de Ct. Além disso, competem pelos reagentes presentes na reação e confere a reação um resultado alterado. Este fato torna ainda mais

problemático quando visualizados em PCR com quantificação absoluta (INVITROGEN). O teste de análise de concentração dos iniciadores 5'UTR mostrou que, mesmo em uma concentração final de 200nM até 60nM, o melhor resultado foi obtido com a concentração de 50nM e 62,5nM. As demais

5 concentrações apresentaram um sinal de fluorescência emitido antes do ciclo 10 (FIGURA 18) (INVITROGEN). Além disso, a concentração do MgCl₂ de 2mM, na mistura, está abaixo do limite máximo estabelecido (3mM). Valores acima disso favorecem a formação de dímeros de iniciadores (INVITROGEN).

10 O alto nível de amplificações inespecíficas, provenientes de formação de dímero de iniciadores, como analisados na maioria dos controles negativos (FIGURA 25, 27, 28, 29, 30), é considerado um problema potencial quando se usa corantes do tipo SYBR Green I. Neste caso, é importante fazer a análise dos produtos da qPCR em gel de agarose 1% para poder determinar a

15 identidade dos picos inespecíficos (RICHARDSON, *et al.*,2006). Apesar dessa importante consideração, este teste ainda deverá ser feito para uma melhor compreensão dos dados.

Para a construção de uma curva padrão é importante que o material genético

20 (DNA ou RNA) seja de uma espécie única e pura, como o DNA plasmidial preparado a partir de um sistema procarioto (APPLIED BIOSYSTEMS). Aliado a isso, é preciso que as diluições sejam feitas corretamente para que o valor do Ct de cada diluição padrão seja plotado em uma regressão linear (DEPREZ, *et al.*, 2001). Isto só foi possível, quando foi usada 10⁸ a 10⁴ cópias de DNA

25 plasmidial, pois a reação, junto com a mistura e com os iniciadores específicos para a região 5'UTR, não foi capaz de detectar quantidades inferiores que 10⁴ cópias de DNA plasmidial, inicialmente.

Outra característica importante é a eficiência obtida na qPCR. A maioria das

30 reações, feitas com curva padrão com 10⁸ a 10⁴ cópias de DNA plasmidial, apresentou uma eficiência entre 85% a 90% (FIGURA 27, 28, 29). Porém esses valores apresentaram um valor de aproximadamente 120% e 150% (FIGURA 25 e 26), após a construção da curva com 10⁶ a 10 cópias de DNA plasmidial, o que pode ser sinal de algum inibidor na reação, como RNA de má

qualidade, alta concentração da amostra testada e presença de substâncias vinda do processo de extração. Outra possível causa é o uso de reagentes (iniciadores, $MgCl_2$, *Taq* DNA polimerase) em baixas concentrações (INVITROGEN).

5

Quando o DNA duplica a cada ciclo, a reação passa a ter uma eficiência de 100% e um valor de regressão linear (*slope*) entre -3.6 e -3.1. Uma eficiência é considerada aceitável quando está entre os valores de 90% a 110%, os quais são determinados pelas amostras mais diluídas. Além disso, o valor do coeficiente linear (R^2) é medido pela reprodutibilidade das replicatas (INVITROGEN). Outra observação é que a diferença de Ct, entre os padrões diluídos na base 10, tem que ser aproximadamente 3,3 ciclos (UNISCIENCE), o que não foi visto na qPCR com a curva padrão de 10^6 e 10 cópias de DNA plasmidial. O valor de R^2 abaixo do ideal (0,99) e um valor de regressão linear (*slope*) acima de -3.4 é sinal de que as amostras amplificadas estão muito concentradas. A razão para se conseguir uma melhor eficiência, quando se usa amostras mais diluídas, é que porque os inibidores presentes na reação, perdem seus efeitos inibitórios (INVITROGEN). Outro ponto interessante foi a diferença de temperatura de dissociação entre a reação desenvolvida e a reação feita com reagentes comerciais (FIGURA 25 e 26).

20

Porém foi observado que os resultados da qPCR variavam entre as reações, possivelmente devido a pequenos erros durante o preparo da mistura. Essa vulnerabilidade dos resultados diminuiu a partir do momento em que as reações foram preparadas com uma pré mistura de reagentes preparados no Laboratório. Da mesma forma, a curva padrão com 10^6 e 10 cópias de DNA plasmidial foi criada após várias tentativas, possivelmente por ter ocorrido pequenas alterações de concentração ainda no preparo dos reagentes que ficam no estoque, antes de serem usados na pré mistura. Esta observação parece ser a mais plausível, pois a metodologia empregada para esta técnica, assim como os iniciadores, sempre foram os mesmos durante todo o desenvolvimento deste estudo.

30

A pureza da amostra a ser testada na qPCR é um fator fundamental para que haja uma técnica com boa qualidade. A extração do RNA feita com o Kit QIAmp® Viral RNA (QIAGEN®, EUA) usa de isotiocianato de guanidina, para
5 lisar a amostra e preservar o RNA da ação das RNAses, e de etanol para as lavagens das impurezas. Apesar dessa técnica produzir um RNA mais puro que a extração por fenol, o excesso de sílica na matriz da coluna pode contribuir para uma síntese de cDNA não tão eficiente (INVITROGEN). Isso, aliado a outros fatores, pode ser umas das explicações para as ampliações
10 tardias dos cDNAs de “pools” de larvas em qPCR (FIGURA 31).

Foram então feitos alguns testes com o intuito de investigar a sensibilidade e a eficiência da qPCR. O uso de cDNA não diluído em uma qPCR favorece o surgimento de um nível alto de fluorescências inespecíficas e uma amplificação
15 menos íngreme. Apesar disso, alguns kits enzimáticos, como a M-MLV RT (Promega Corporation-EUA) usada neste estudo, contêm DTT (ditioteitol), um agente que protege as pontes dissulfídicas do RNA contra a oxidação e confere uma estabilidade a enzima. O uso de cDNA sintetizado com reagentes que contêm o DTT contribuem com a interferência do sinal da fluorescência
20 (DEPREZ, et al., 2001; RICHARDSON, *et al.*,2006). Apesar de contraditório, os resultados obtidos com a diluição do cDNA dos “pools” das larvas foi considerado de qualidade inferior quando comparado com os resultados obtidos com o mesmo cDNA não diluído (FIGURA 22). O fato de ir contra dados da literatura, está possivelmente interligado com a pouca quantidade de
25 material obtido nos “pools” de larvas. Porém é necessário fazer uma reação de RT com a enzima que não apresenta o DTT como um de seus componentes, para que possa realmente confirmar estes dados.

O ponto chave para obter bons resultados na qPCR é a qualidade do cDNA
30 proveniente da reação de RT (WILKENING *et al.*, 2004). Alguns cDNAs de “pools” de larvas testados em mais de uma qPCR, apresentaram resultados

distintos (dados não mostrados). Isto pode ser resultado de uma possível degradação do cDNA após vários descongelamentos DEPREZ, et al., 2001.

O teste feito na qPCR com cDNA sintetizados com iniciadores randômicos e iniciadores específicos para a região 5'UTR de DENV revelou que a amplificação acontece em ciclos mais tardios quando são usados os iniciadores randômicos (FIGURA 21). Estes são hexâmeros que possuem baixa especificidade e produzem cDNA de origem variada, enquanto o outro sintetiza apenas o cDNA proveniente da região específica. Segundo DEPREZ, et al., 2001 o cDNA sintetizado com iniciadores hexâmetros confere ao coeficiente de regressão linear (R^2) um valor baixo e uma eficiência abaixo de 100% na qPCR. Contudo, o uso de iniciadores randômicos na síntese do cDNA podem contribuir com uma alta sensibilidade em qPCR, principalmente quando usado em RNA ausente de cauda poli-A. Por parearem, aleatoriamente, por todo o RNA, a presença de estruturas secundárias não é considerada um complicador, como em casos de uso de iniciadores gene específicos e em iniciadores oligo(dT) (INVITROGEN)

Em uma qPCR, todo o sinal fluorescente emitido indica ser referente a amplificação de interesse. Porém, esses dados precisam ser validados através de um controle negativo na qPCR e de um controle negativo da RT. Em um controle negativo da qPCR todos os reagentes são adicionados com exceção da amostras, indicando que qualquer amplificação observada nesta amostra, é sinal de formação de dímeros de iniciadores ou de contaminação com a amostra em teste. No controle negativo da RT são adicionados todos os reagentes, exceto a enzima. Qualquer amplificação, vinda deste controle, indica a presença de DNA na amostra de RNA (INVITROGEN). Os dados presentes nas qPCR, feitos neste estudo, deverão ser validados com este controle da reação de RT.

Muitas variáveis podem estar presentes em uma qPCR, como: a integridade do RNA, a RT e até mesmo a amplificação obtida na qPCR. O uso de um normalizador é necessário para neutralizar os efeitos obtidos com essas variáveis (INVITROGEN) e sua análise será através da emissão de sinais constantes (HEID, et al.,2009).

Apesar de muitos estudos usarem a β -actina e a GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), a região escolhida para obter iniciadores normalizadores neste estudo foi o gene da glutamino sintetase em *Aedes sp.* Ele é responsável pelo metabolismo e transmissão do glutamato no tecido neurotransmissor do inseto, além de apresentar relações na formação da camada periotrófica durante a digestão do sangue ingerido pelo inseto (SMARTT, et al., 1998). A quantificação de genes endógenos é geralmente problemática, pois podem ocorrer variações de expressão entre os tecidos analisados, entre as formas de desenvolvimento e com a fisiologia do mosquito vetor. Por isso alguns estudos analisam a expressão do RNA total para evitar a diferença de expressão entre os RNAm (RICHARDSON, et al.,2006). Porém o uso do RNA como normalizador pode apresentar diferenças na RT, alterando assim, a eficiência da qPCR (INVITROGEN).

Os iniciadores endógenos desenhados com o auxílio do programa ClustalW versão 2.0, apresentaram ausência de formação de dímero e foram capazes de reconhecer apenas o RNAm da glutamino sintetase. No teste feito em PCR quantitativo, usando “pools” com 10 e 15 larvas e um “pool” com 5 mosquitos, foi possível amplificar o gene da glutamino sintetase, tendo o pool de mosquito um valor médio do Ct=30 e as larvas um Ct=35 (FIGURA 23). Essa diferença provavelmente relaciona-se com a indução do RNAm da glutamino sintetase após o respasto sanguíneo feito pelo mosquito-vetor, o que indica que sua expressão é potencialmente maior na forma adulta (mosquito) do *Aedes sp.* Contudo, estudos já confirmaram a sua expressão em pupas e em larvas, no estágio L3, o que indica que a enzima glutamino sintetase está envolvida em outras vias, como a biossíntese de aminoácidos (SMARTT, et al., 1998). Isto também foi confirmado em outros estudos usando “pools” de larvas com

quantidade variadas de larvas. Os “pools” com o mesmo número de larvas, provavelmente não amplificaram a glutamino sintetase em tempos próximos, por existir larvas em estágio diferente de desenvolvimento ou a presença de algum inibidor. A glutamino sintetase é somente ativada na presença de ADP, sendo o ATP, junto com íons metais Mg^{2+} e Mn^{2+} , inibidores irreversíveis da enzima. Além disso, o pico de concentração da enzima glutamino sintetase, no intestino do inseto, é correspondente ao tempo necessário a formação da matriz periotrófica em *Aedes aegypti* (SMARTT, et al., 1998). Tanto na síntese do cDNA quando na amplificação de um gene alvo, com nível de expressão diferentes entre as amostras, o normalizador produzirá variáveis durante a qPCR (INIVTROGEN). De toda forma, outros estudos devem ser feitos para que haja uma análise mais detalhada do gene da glutamino sintetase como normalizador na PCR quantitativa.

15

20

25

30

VII. CONCLUSÕES

- 5 ✓ Os iniciadores específicos para a região 5'UTR conseguiram amplificar essa região nos 4 sorotipos de DENV isolados em cultivo celular, tanto em PCR quanto em PCR quantitativo, conferindo um amplicon de 148pb e uma temperatura de dissociação de aproximadamente 82°C, respectivamente. Nos pools de larvas, essa amplificação não foi tão criteriosa quando feita em PCR quantitativo, pois não foi possível
- 10 confirmar se em um determinado pool haveria larvas infectadas com DENV. Isto porque, na maioria das amostras analisadas, houve mais de uma temperatura de dissociação, o que impediu que o resultado fosse confiável.
- 15 ✓ Os iniciadores específicos para a região da glutamino sintetase de *Aedes sp* que foram desenhados como normalizadores da PCR quantitativa amplificaram tanto o cDNA de larvas quanto de mosquito na qPCR. Portanto, essa amplificação ocorreu em ciclos finais da reação e
- 20 houve diferença quanto a temperatura de dissociação de ambas. É necessário fazer testes com estes iniciadores na PCR.
- 25 ✓ O uso de reagentes caseiros no preparo da PCR quantitativa resultou em variações de resultados durante o preparo da curva padrão. Inicialmente a sensibilidade da reação, relacionada com a mesma temperatura de dissociação entre todos os pontos da curva, era de apenas 10^4 cópias de DNA plasmidial. Contudo, o preparo dos reagentes que compõem a mistura, por ser um método caseiro, está
- 30 passível a pequenas alterações que, por serem usadas na PCR quantitativa, as variações passam a ser mais perceptíveis. Isto explica as reações feitas com a curva padrão com 10^6 e 10^8 e com as com 10^4 e 10^8 cópias de DNA plasmidial.

- ✓ O uso de cDNA de larvas nas PCR quantitativas, com reagentes caseiros, apresentava um valor médio de Ct, na maioria das reações, acima ou muito próximos do valor médio do Ct do controle negativo, feito com água estéril. Isto impediu que houvesse uma credibilidade e confiança nos resultados apresentados, mesmo quando a amostra testada apresentava uma temperatura de dissociação compatível com o controle positivo da reação. Aliado a isso, a falta de um controle da reação de transcriptase para cada pool de larva testado, impediu que fosse verificado a eficiência dos cDNA testados.

5

10

15

20

25

30

VIII. PERSPECTIVAS

- ✓ Desenvolver uma qPCR empregando iniciadores já padronizados para esta reação;

5

- ✓ Ajustar as concentrações dos reagentes usados na mistura com valores semelhantes aos utilizados no Master Mix comercial (SYBR Green[®] PCR Master Mix, Applied Biosystems).

10

- ✓ Analisar a eficiência de cDNA sintetizado com iniciadores randômicos e com os específicos em reações enzimáticas sem a presença de DTT (ditiotreitól) e testa-los em qPCR. Fazer o controle da transcriptase reversa para cada amostra a ser testada. Testar novas formas de extração de RNA, com o intuito de obter uma amostra livre dos inibidores da qPCR.

15

- ✓ Testar novas curvas padrões e fazer análises quantitativas da carga viral de larvas e de mosquitos de *Aedes sp* infectados com DENV.

20

25

30

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPLIED BIOSYSTEMS- Curso PCR quantitativo em Tempo Real

5 AQUINO, VH, FIGUEIREDO, LT, *et al.*,. A simple one-step real-time PCR for diagnosis of dengue virus infection. J. Med. Virol.2008 80 (8): 1426-1433.

AQUINO, VH; ANATRIELLO, E., *et al.* Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. Am. J. Trop. Med. Hyg.2006. 75(4): 710-715.

10

AYERS, M., D. ADACHI, *et al.* A single tube RT-PCR assay for the detection of mosquito-borne flaviviruses. J Virol Methods. 2006. 135(2):235-239.

15

BEERNTSEN BT, JAMES AA, CHRISTENSEN BM. Genetics of mosquito vector competence. Microbiol Mol Biol Rev. 2000. 64: 115-37.

20

BENNETT, KE, OLSO, KE, *et al.* Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. Am. J. Trop. Med. Hyg.2002. 67(1): 85-92.

BIOTIUM, INC- www.biotium.com

25

CHAO, D. Y; B. S. DAVIS, *et al.* Development of Multiplex Real-time reverse

transcriptase PCR assays for detecting eight medically important Flaviviruses in mosquitos. J. Clinical Microbiology. 2007. 45(2):584-589.

5 CHEN, C.H.; F.M. HOFMAN; *et al.* Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus- induced hemorrhage. .Journal of Virology. 2007. 5518-5526.

10 CHIEN, L.J., LIAO, T.L., *et al.* Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viroses. J.Clin.Microbiol.2006. 44(4):1295-1304.

CHUTINIMITKUL S, *et al.* Dengue typing assay based on real-time PCR using Sybr Green I. J.Virol.Methods. 2005. 129(1): 8-15.

15 CONSOLI & LOURENÇO-OLIVEIRA. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. FIOCRUZ-Rio de janeiro. 1994

20 DE THOISY, B., V. LACOSTE, *et al.* Dengue infection in neotropical forest mammals. Vector Borne Zoonotic Dis. 2009. 9(2):157-170.

DEPREZ, R.H, *et al.* Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using Sybr Green I depends on cDNA synthesis conditions. Anal.Biochem. 2001. 1307(1):63-69.

25 EVANGELISTA, K.S. Estudo da transmissão vertical de Dengue virus em mosquitos do gênero Aedes no município de Belo Horizonte. 2003. Dissertação

(Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

5 FERNÁNDEZ, Z. O. P. FORANTIN. Sobrevivência de populações de *Aedes albopictus*: idade fisiológica e história reprodutiva. *Rev. Saúde Pública*. 2003. 37(3):285-291.

10 FIGUEIREDO, L.B. Isolamento, identificação e caracterização de amostras isoladas de *Dengue virus 3* circulantes em Minas Gerais no período de 2002 a 2004. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

15 FIGUERIREDO, L. B. A. CECÍLIO, *et al.* Dengue virus 3 genotype 1 associate with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008. 14(2):314-316.

FREITAS, RM. A review on the ecological determinants of *aedes aegypti* (diptera: culicidae) vectorial capacity. *Oecologia Australis*. 2010. 14(3).

20 FUNASA. *Biologia do vetor*. 2001. p.11-22.

GIBBONS, R. V. e D. W. VAUGHN. Dengue: an escalating problem. *Bmj*. 2002. 324(7353):1563-1536.

GOFFART, I. L. M. BARAGATTI *et al.* Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *Journal of Clinical Virology*. 2009. 45:61-66.

- 5 GUBLER D.J., G KUNO., *et al.* Flavivirus. In: *Fields Virology*. 5th Edition. KNIPE D.M., HOWLEY P.M., Griffin D.E., LAMB R.A. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. USA, 2007.

- 10 GUBLER, D.J. and, R SATHE. Proceedings of the international symposium on yellow fever and dengue. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. In a Homma and JF Cunha. 1998. 291-322.

GUZMAN, MG., HALSTEAD, SB., *et al.* Dengue: a continuing global threat. *Nat.Rev.Microbiol.* 2010. 8(suppl):S7-S12.

15

HALSTEAD, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol.* 2008. 53: 273-291.

HALSTEAD, S. B. Dengue. *Lancet.* 2007. 370(9599):1644-1652.

20

HARIS, E., KYLE, JL..Global spread and persistence of dengue. *Annu.Rev.Microbiol.*2008. 62:71-92.

- 25 HASTEALD, S.B. Pathogenesis of Dengue: Challenges to molecular biology. *Science.*1988. 239(4839): 476-481.

HEID, *et al.* Real-time quantitative PCR. 2009

HILL, *et al.* Rapid identification of *Aedes scutellaris* and *Aedes aegypti* life stages using real-time polymerase chain reaction assays. *Am.J.Trop.Med.Hyg* 5 2008. 79(6): 866-875.

INTERNACIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV): (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>).

10 INVITROGEN- Real Time PCR- from theory to practice.2008.

IWERSEN, A, KUPEK, E, *et al.* Software for pattern recognition of the larvae of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. 2002. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35(3).

15 JOHN, VT. Detection of dengue viral infections in *Aedes* mosquitoes: an essential tool for epidemiological surveillance. 2009. *Indian J Med Res.* 2009. 129(6):665-8..

JOSHI, Mouyra DT, Sharma RC *et al.* Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes *Am J Trop Med.* 2002 20

KOBAYASHI N., THAYAN R. *et al.* Type-3 dengue viruses responsible for the dengue epidemic in Malaysia during 1993-1994. *Am J Trop Med Hyg.* 1999. 60: 25 904-909.

LAUE, T, Emmerich P, Schmitz,H. Detection of Dengue virus RNA in pacientes after primary or secundar dengue infections by using the TaqMan automated amplification system. Journal of Clinical Microbiology, August 1999. 37(8): 2543-2547.

5

LEYSSEN P., E. DE CLERCQ *et al.* Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. Clin Microbiol Rev. 2000. 13: 67-82.

10 LINDENBACH, B.D., H. J.THIEL, C. M. RICE. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE D.M., HOWLEY P.M., Griffin D.E., LAMB R.A. Fields Virology. 5th Edition, vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. USA, 2007.

15 LUTFALLA G, UZE G. Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments. Methods Enzymol. 2006. 410(386).

MAIRUHU, A. T., J. WAGENAAR, *et al.* Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004. 23(6): 425-33.

20 MARTINA, BE, KORAKA P, OSTERHAUS AD *et al.* Dengue virus pathogenesis: an integrated view. Clin Microbiol Rev. 2009. 22(4):564-81.

MELLOR, PS. Replication of arboviruses in insect vectors. J Comp Pathol. 2000.123(4):231-47.

25

MIAGOSTOVICH M. P., DOS SANTOS F. B. *et al.* Genetic characterization of

dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz J Med Biol Res.* 2002. 35: 869-872.

5 MONATH, T.P.; TSAI, T.F. Flaviviruses. In: *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone. 1997. 1146-1155.

MUKHOPADHYAY, S., R. J. KUHN, *et al.* A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005. 3(1): 13-22.

10 NAZE F, LE ROUX K, SCHUFFENECKER I, ZELLER H, STAIKOWSKY F, GRIVARD P, MICHAULT A, LAURENT P. Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and Dengue virus typing using high resolution melting. *J Virol Methods.* 2009.162(1-2):1-7.

15

PARIDA, M. M. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *J Biosci.* 2008. 33(4): 617-628.

20 PAUPY, C., H. DELATTE, *et al.* *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes Infect.*,. 2009.

PESSANHA JEM, CAIAFFA WT, KROON EG, PROIETTI FA. Dengue em três distritos sanitários de Belo Horizonte, Brasil: inquérito soropidemiológico de base populacional, 2006 a 2007. *Rev Panam Salud.* 2010. 27(4):252-8.

25

RICHARDSON, J., A. MOLINA-CRUZ, *et al.* Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 2006. 74(1): 132-141.

5 RODRIGUEZ-BARRAQUER I, CORDEIRO MT, BRAGA C, DE SOUZA WV, MARQUES ET, CUMMINGS DA. From Re-Emergence to Hyperendemicity: The Natural History of the Dengue Epidemic in Brazil *PLoS Negl Trop Dis.* 2011. 45(1).

10

ROSEN L, SHROYER DA, TESH RB, FREIER JE, LIEN JC. Transovarial transmission of dengue viroses by mosquitos: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 1983. 32(5):1108-19.

15

SAMPATH A, PADMANABHAN R. Molecular targets for Flavivirus drug Discovery. *Antiviral Res.* 2008. 81(1):6-15.

20 SÁNCHEZ, C.C. Dengue en el Perú: aportes para su diagnóstico y control. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2005. 22: 212-228.

SECRETARIA NACIONAL DE SAÚDE. www.saude.gov.br

25 SHU PY, CHANG SF, KUO YC, YUEH YY, CHIEN LJ, SUE CL, LIN TH, HUANG JH. Development of group and serotype specific one step Sybr Green I- based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol.* 2003. 41(6):2408-16.

SINGHI, S., N. KISSOON, *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. *J Pediatr (Rio J)*. 2007. 83(2): 22.

5 SMARTT, *ET AL.* SMARTT CT, CHILES J, LOWENBERGER C, CHRISTENSEN BM. Biochemical analysis of a blood meal-induced *Aedes aegypti* glutamine synthetase gene. *Insect Biochem Mol Biol*. 1998. 28(12):935-45.

10 SMIT, JM, RODENHUIS-ZYBERT IA, WILSCHUT J. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2010 . 67(16):2773-86.

TEIXEIRA, M. G.; M. C. N. COSTA *et al.* Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad. Saúde Pública do Rio de Janeiro*. 2009.

15

THENMOZHI, V., J. G. HIRIYAN, *et al.* Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Kerala, a southern Indian state. *Jpn J Infect Dis*. 2007. 60(5): 245-249.

20 UNISCIENCE- Princípios básicos da PCR em Tempo Real.

VILELA, A. P. P. Monitoramento do *Dengue virus* circulantes em larvas e mosquitos adultos de *Aedes aegypti*. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
25 Minas Gerais, Belo Horizonte.

VILELA AP, FIGUEIREDO LB, DOS SANTOS JR, EIRAS AE, BONJARDIM CA, FERREIRA PC, KROON EG. Dengue virus 3 genotype i in aedes aegypti mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. *Emerg Infect Dis.* 2010. 16(6):989-92.

5

WANG WK, LEE CN, KAO CL, LIN YL, KING CC. Quantitative competitive reverse transcription-PCR for quantification of dengue virus RNA. *J Clin Microbiol.* 2000. 38(9):3306-10

10 WEAVER, S. C. e N. VASILAKIS. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 2009. 9(4): 523-540.

15 WHITEHEAD, S. S., J. E. BLANEY, *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews.* 2007. 5: 518-528.

WILKENING S, BADER A. Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model. *J Biomol Tech.* 2004. 15(2):107-11.

20

WOODRING, J. L.; HIGGS, S.; BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. *The biology of disease vectors.* 1996 pp. 51-76.

25 WORLD HEALTH ORGANIZATION <<http://gamapserver.who.int/mapLibrary>>. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2010