

ELISEU SOARES DE OLIVEIRA ROCHA

**PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO ENVELOPE DE
Dengue virus E DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS NA
POPULAÇÃO DE BELO HORIZONTE, MG.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Co-Orientadora: Dra. Jaquelline Germano de Oliveira

BELO HORIZONTE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFMG

2010

Rocha, Eliseu Soares de Oliveira
Produção das proteínas recombinantes do envelope de *Dengue virus* e
detecção de anticorpos específicos na população de Belo Horizonte, MG.
[manuscrito] / Eliseu Soares de Oliveira Rocha. – 2010
114 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Erna Geessien Kroon. Co-orientadora: Jaqueline Germano
de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Geras, Instituto
de Ciências Biológicas.

1. Ensaio imunoenzimático - Teses. 2. Microbiologia – Teses. 3.
Sorodiagnóstico – Teses. 4. Dengue – Teses. 5. Virus da dengue – Teses. 6.
Virologia médica – Teses. 7. Antígenos recombinantes. I. Kroon, Erna
Geessien. II. Oliveira, Jaqueline Germano de. III. Universidade Federal de
Minas Geras. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616.988-071



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

ALUNO: ELISEU SOARES DE OLIVEIRA ROCHA

Nº matrícula: 2008652399

Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL MESTRADO

Defesa de Dissertação: 22 de fevereiro de 2010

Título: "Produção das proteínas recombinantes do envelope de *Dengue virus* e detecção de anticorpos específicos na população de Belo Horizonte, MG"

Co-orientadora: Profa. Jaquelline Germano de Oliveira

A Dissertação foi submetida à apreciação da Profa. Giliane de Souza Trindade que emitiu parecer favorável.


Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli
Examinadora

Aprovado: *Sim*

Alzira
Profa. Alzira Batista Cecílio
Examinadora

Aprovado: *Sim*


Profa. Erna Geessien Kroon
Orientadora

Aprovado: *Sim*


Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida e saúde, pela sabedoria e conhecimento, amor e esperança. Por colocar ao meu lado pessoas tão especiais, situações tão favoráveis, dificuldades muitas vezes superáveis e provar-me que “tudo é possível ao que crê” (Mc 9:23).

Aos meus pais por me ensinar os primeiros passos, por tirarem os tropeços e indicarem o caminho das pedras, vocês nunca me desampararam ou impediram-me quando vislumbrei e sonhei. Vocês são parte de tudo isso e parte de mim.

Aos meus irmãos pela convivência, pela compreensão enquanto eu chegava do trabalho com poucas palavras, por me apoiarem mesmo nas minhas ausências, pelas fotos das viagens que não pude fazer e pelas lembrancinhas que nos faziam mais próximos uns dos outros.

À minha querida noiva, Jeilie. Estar ao seu lado faz de mim, simplesmente, a pessoa mais feliz deste mundo. Obrigado pela companhia, convívio e carinho. Por ensinar que na vida há coisas que ouro e prata não compram e nem ferrugem desgasta.

Aos meus avôs - Eliseu e Railda, Rubens (*in memoriam*) e Dalva - por me darem pais tão maravilhosos. Vocês são exemplos de respeito, responsabilidade, vitórias e conquistas.

Aos meus tios e tias por todo apoio e incentivo.

À Professora Dra. Erna Geessien Kroon pela orientação, pelos auxílios e pelo exemplo. Muito obrigado por ter aberto as portas que permitiram que eu chegasse até aqui, por acreditar em mim, por tornar meus resultados em meus aliados e por ensinar-me avaliar o que tenho em mãos.

À Dra. Jaquelline Germano de Oliveira pelo incentivo, respeito e bons “puxões de orelha” no “tatu” aqui. Com você aprendi mais que boas práticas de laboratório, foram excelentes práticas de laboratório! Suas dicas, suas notas e suas manias me

acompanham na bancada até hoje. E quando me esqueço de algum detalhe, logo penso: Se fosse a Jaque teria anotado.

Ao Prof Dr. Paulo Cesar Peregrino Ferreira por todo auxílio e incentivo, e que, com sua celebre frase, nos remete a boas lembranças. “Chefe não é chefe por acaso”.

Ao Prof Dr. Claudio Antônio Bonjardim por toda serenidade e facilidades.

Ao João Rodrigues dos Santos pelos protocolos mal-elaborados, pelas garrafas de células sofridas e quase mortas e por reconhecer nossa ignorância, mas mesmo assim não deixar de acreditar no potencial das pessoas, seja paulista ou mineiro. Mas, principalmente, por **não** nos dar soluções prontas, e sim, dúvidas ainda mais complexas. Não posso deixar de agradecer a todo seu esforço na execução das soroneutralizações que foram de grande valia neste trabalho.

À Profa. Dra. Giliane Trindade de Souza pela alegria e descontração de sempre, além dos esforços na manutenção da ordem no laboratório, como reuniões, seminários, limpeza, pedido de auxílio para congressos e outros.

À Ildinha e Andreza por tornarem nossa bagunça em um lugar mais habitável, por ensinar que os primeiros passos dentro do laboratório passam pela cozinha.

À Tia Angela pela serenidade e sabedoria. Seus conselhos são preciosidades, suas enquetes são marcantes e nossas conversas, no mínimo, divertidas. “Você nasceu para brilhar!”

Aos Doutores Fernando Augusto Proietti e José Eduardo Pessanha e toda a equipe da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte por todo envolvimento na coleta das amostras de soro.

Ao Grupo de Dengue, digo coletivamente: somos heróis! Trabalhar com *Dengue virus* nunca foi uma tarefa fácil. Mas vocês fizeram deste desafio sementes de coragem e persistência, no qual os frutos estão em cada um de nós.

Ao Gustavo Portela, você se superou. Como que saiu alguma coisa do meio de tanta bagunça? – Brincadeirainha – Mas a resposta está aí, professor federal. Aproveito para desejar toda a felicidade do mundo pra você e Lina.

À Leandra Figueiredo, minha co-orientadora por consideração, soube transmitir toda a sua calma e sabedoria nos meus intermináveis questionamentos sobre Biologia Molecular. Seu companheirismo foi excepcional, comparável apenas ao da Gi.

À Gisele Olinto, excelente na bancada, mas quando o assunto é computador... esquece! Mas tudo bem, o que importa é que você soube traduzir as ondas não decodificadas, as dicas nos momentos mais tensos.

À Marcela Cota pela amizade, simpatia e divisão de tarefas. Seus esforços renderam diversas soroneutralizações que eu pensava que nunca dariam certo.

À Flávia Viana pela amizade e sonoridade, meu controle negativo de todas as placas.

Ao Dr. André Fernandes pela sabedoria compartilhada, por me ensinar organização e metodologia no trato das amostras biológicas. Um dia eu chego lá!

Ao Jonatas Abrahão pela amizade, sabedoria, bom humor e paciência. Se todos os labvirianos fossem como você, seríamos mais monótonos, mas bem mais felizes. Toda sua solicitude me inspirou nestes três anos de Labvírus. Seu sucesso é certo!

À grande Lorena D'Anunciação Silva pela paciência em trabalhar arduamente ao meu lado. Não que eu trabalhasse muito, mas por sofrer em silêncio a dura função de estagiária do Eliseu. Com você aprendi a pedir, a cooperar, a ensinar, o trabalho em equipe e divisão tarefas. Sua paciência fez de mim uma pessoa melhor ☺.

Ao Leonardo Camilo e Jonas Dutra, GTS's de plantão nas minhas intermináveis dúvidas sobre Western blot, Dot blot, membranas de nitrocelulose, tampão de transferência... Colegas de turma do Mestrado e companheiros de Bandeirão, vocês fizeram da minha passagem por GTS mais tranquila e descomplicada.

À Profa. Dra. Jaqueline Maria Siqueira, pela primeira oportunidade que tive em lecionar na UFMG, por dividir comigo seus conhecimentos de fermentação, produção de proteínas recombinantes e nos procedimentos de imunização.

À Graciela Lima pela paz e sensibilidade transmitida todos os dias, além de ser um exemplo de pesquisadora.

Ao Bruno Eduardo Mota pela alegria contagiante capaz de tornar o Lab4 o lugar mais habitado do ICB, pelas dicas no trato com animais de laboratório e pelos artigos só disponíveis no CDC.

Ao Marcelo Freitas pelas boas conversas sobre perspectivas e projeções.

Aos colegas do LVC: Tania Mara, Barbara Quinan, Iara Borges, Leandro Vida, Dani, Ruiz Astigarraga e Fabis, pelas parcerias e trocas de materiais, conhecimento e alegrias.

Aos tantos amigos que fiz no Laboratório de Vírus: Bruno Brasil, Flavia Gama, Luciana Bessa, Luciana Garcia, Katia Souza, Carla Amaral, Marieta Assis, Pedro Augusto, Rafael Palhares, Thiago Campolina, Jamária Pinheiro, Ana Celi, Landa Sousa, Diogo Pádua, Tania Apolinário, Guilherme Zolini, Filippo Turrini, Vanessa Melo, Felipe Assis, Bráulio Lima, Fernanda Lins, Rafael Campos, André Fabrício, Larissa Siqueira, Uschi, Marcela, Grazi, Denise, Poliana, Priscila e todos os IC's. Perdoem-me se esqueci de alguém. A culpa é da correria. Faltam palavras que expressem meus sentimentos de gratidão.

À Jordana Reis, pela contribuição na valorização dos dados coletados, com aulas e testes estatísticos para que este trabalho pudesse ser devidamente validado.

Aos professores do Departamento de Microbiologia da UFMG, em especial Dra. Edel Stancioli e Dr. Flávio Fonseca por todo auxílio e facilidades.

À todos os meus colegas de bancada destes dois anos e a todos que se envolveram de alguma forma neste trabalho. Não existem bons trabalhos sem que haja boas equipes.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro, sem o qual seria impossível a execução desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
1. RESUMO.....	5
2. ABSTRACT	6
3. INTRODUÇÃO	7
3.1. Histórico	7
3.2. Família <i>Flaviviridae</i>	8
3.3. Morfologia e Genoma Viral	9
3.4. Multiplicação dos vírus do gênero <i>Flavivirus</i>	11
3.4.1. Proteínas dos vírus do gênero <i>Flavivirus</i>	13
3.5. Ciclo de Transmissão.....	15
3.6. Epidemiologia.....	19
3.7. Manifestações clínicas	23
3.8. Patogênese.....	25
3.9. Resposta imunológica.....	27
3.10. Diagnóstico laboratorial.....	30
3.11. Produção de insumos para diagnóstico laboratorial.....	32
4. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	37
5. OBJETIVOS	39
5.1. Objetivo Geral	39
5.2. Objetivos Específicos.....	39
6. MATERIAL E MÉTODOS	40
6.1. Coleta e armazenamento das amostras clínicas.....	40
6.2. Células	40
6.3. Vírus.....	41
6.4. Multiplicação do vírus.....	41
6.5. Titulação viral	42
6.6. Proteínas recombinantes	42
6.6.1. Produção de proteína E recombinante	43
6.6.2. Purificação da proteína recombinante	44
6.7. Produção de anticorpos policlonais anti-DENV.....	44

6.8. Teste de soroneutralização	45
6.9. IgG-ELISA para avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes...46	
6.10. IgG-ELISA para detecção de anticorpos específicos anti-DENV em amostras de soro do inquérito epidemiológico de Belo Horizonte	47
6.11. IgG ELISA de captura para detecção de anticorpos anti-DENV em soros humanos	48
6.12. Tratamento estatístico.....	49
7. RESULTADOS	51
7.1. Produção e purificação de proteínas recombinantes do envelope dos quatro sorotipos de DENV.....	51
7.2. Produção de anticorpos policlonais anti-DENV.....	54
7.3. Avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes produzidas	55
7.4. Padronização do ELISA para detecção de IgG anti-DENV em soro humano .56	
7.5. Avaliação das amostras do inquérito epidemiológico de Belo Horizonte para o IgG-ELISA e para o teste de soroneutralização	60
7.6. Análise de sensibilidade/especificidade do teste de IgG-ELISA	74
7.7. Avaliação das amostras discordantes entre o teste IgG-ELISA e soroneutralização por kit comercial DENV	78
8. DISCUSSÃO	81
9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	89
10. REFERÊNCIAS.....	91
ANEXOS	104
Anexo 1 – Declaração de Consentimento.....	104
Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG	105
Anexo 3 – Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	106
Anexo 4 – Relatório do programa MedCalc®.....	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Partícula viral e estrutura do Genoma do vírus do gênero <i>Flavivirus</i>	10
FIGURA 2. Estrutura e organização do genoma do <i>Dengue virus</i>	11
FIGURA 3. Ciclo de replicação do DENV.....	12
FIGURA 4. Conformação de dois monômeros da proteína E de DENV-2	14
FIGURA 5. Ciclo enzoótico e epidêmico de transmissão do vírus da dengue	16
FIGURA 6. <i>Aedes aegypti</i> alimentando-se de sangue.....	17
FIGURA 7. Mapa dos países ou áreas do mundo em risco de infecções por <i>Dengue virus</i> em 2007.....	18
FIGURA 8. Distribuição de <i>A. aegypti</i> nas Américas durante os anos de 1930, 1970 e 2007	19
FIGURA 9. Média anual do número de casos de FD/ FHD notificados para a OMS e de países com casos de dengue.....	20
FIGURA 10. Número de casos de FD e FHD durante o ano de 1997.....	21
FIGURA 11. Esquema de classificação da infecção por <i>Dengue virus</i> criado pela Organização Mundial de Saúde	23
FIGURA 12. Gráfico da relação entre o início da infecção por DENV, sintomas e resposta imune por anticorpos	29
FIGURA 13 - Produção das proteínas recombinante do envelope (E) de DENV 1-4 em <i>E. coli</i>	52
FIGURA 14 - Purificação das proteínas recombinantes do envelope de DENV 1-4 em coluna de quelato de níquel	53
Figura 15 - Agrupamento das amostras de acordo com os resultados obtidos no IgG-ELISA e teste de soroneutralização	74
FIGURA 16 - Gráfico de dispersão de amostras testadas pelos métodos de IgG-ELISA e soroneutralização	75
FIGURA 17 - Gráfico da curva ROC para o teste IgG-ELISA.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Quantificação e produção final das proteínas Den1E, Den2E, Den3E e Den4E	54
TABELA 2. IgG-ELISA de soros de coelho imunizados e não imunizado com DENV ou proteína recombinante do E de DENV-3	55
TABELA 3. – Média das leituras, em absorbância, dos controles positivos e negativos e relação P/N para as concentrações 1000, 500 e 250ng de proteína Den1E e para o DENV-1 inativado.....	57
TABELA 4. Médias das leituras, em absorbância, dos controles positivos e negativos e relação P/N para as concentrações 100 e 200ng de proteína den1E, den2E, den3E e den4E.....	57
TABELA 5. Médias das leituras, em absorbância, dos controles positivo e negativo e relação P/N para as concentrações de 100 e 40 ng de proteína den1E, den2E, den3E e den4E por câmara	58
TABELA 6. Médias das leituras, em absorbância, de 4 controles positivos e 3 controles negativos e a relação P/N para as diluições de conjugado 1:5.000, 1:10.000 e 1:20.000 e para as concentrações de 20ng e 40ng de cada proteína recombinante por câmara	59
TABELA 7. Médias das leituras, em absorbância, de 7 controles positivos e 14 controles negativos e a relação P/N para as diluições de conjugado 1:2.000 e 1:5.000 na concentração de 40 ng de cada proteína recombinante por câmara	58
TABELA 8. Resultados do IgG-ELISA, em absorbância, de amostras positivas e negativas, confirmadas pelo teste de soroneutralização para DENV 1-3	60
TABELA 9. Resultado do IgG-ELISA, em absorbância, e do teste de soroneutralização para DENV-1, DENV-2 e DENV-3 das 704 amostras do inquérito epidemiológico de Belo Horizonte	61
TABELA 10. Representação geral do IgG-ELISA perante o teste de soroneutralização	77
TABELA 11. Índices de desempenho da pesquisa de IgG anti-DENV, proposto pelo teste IgG-ELISA , na identificação de indivíduos que tiveram contato com prévio com o DENV	78
TABELA 12. Quadro comparativo dos resultados de três testes sorológicos para diagnóstico do dengue	79

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - Albumina bovina sérica
BOD - Baixo oxigênio dissolvido
C - Proteína do capsídio
CD - Células dendríticas
CMC - Carboximetilcelulose
CG - Complexo de Golgi
CO₂ - Dióxido de carbono
DC - Depois de Cristo
DC-SIGN - Ligante de molécula de adesão intercelular não integrina (do inglês, "Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin")
DENV - *Dengue virus*
DENV-1 - *Dengue virus 1*
DENV-2 - *Dengue virus 2*
DENV-3 - *Dengue virus 3*
DENV-4 - *Dengue virus 4*
DMEM – meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA - Ácido desoxirribonucléico
E - Proteína do Envelope
EDA - Estímulo Dependente de Anticorpo
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA - Ensaio imunoenzimático
EUA - Estados Unidos da América
FC - Fixação do complemento
FD - Febre do dengue
FHD - Febre hemorrágica do dengue
GRP78/BiP - Proteína 78 regulada pela glicose/proteína de ligação a imunoglobulina
IF - Imunofluorescência
IFN - Interferon
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
IH - Inibição de hemaglutinação
IPTG - isopropil-β-D-tiogalactosídeo
Kb - Quilobases
KDa - Quilodalton
M - Proteína de membrana
MAC-ELISA - Ensaio imunoenzimático para captura de IgM
μg - Micrograma
μL - Microlitro
mL - mililitro
m.o.i - multiplicidade de infecção

NASBA - Amplificação baseada na sequência de ácido nucleico
NK - Natural killer
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
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORF - Janela aberta de leitura (do inglês, "open reading frame")
PAGE - Gel de poliacrilamida para eletroforese
PBS - Tampão fosfato salina
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PrM - Proteína de Pré-membrana
Poli A - Poliadenina
P/v - Peso por volume
RER - Retículo Endoplasmático Rugoso
Rpm - Rotações por minuto
RNA - Ácido Ribonucleico
RNAm - Ácido Ribonucléico mensageiro
RT-PCR - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RV - Razão de Verossimilhança
SCD - Síndrome do Choque da Dengue
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SFB - Soro fetal bovino
SN - Soroneutralização
UFP - Unidades formadoras de placa
UI - Unidades internacionais
URT - região terminal não codificadora
UV - Ultravioleta
V - Volts
VPP - Valor Preditivo Positivo
VPN - Valor Preditivo Negativo

1. RESUMO

A dengue é a arbovirose mais prevalente no mundo, principalmente nas regiões tropicais. A doença é endêmica em mais de 100 países na África, nas Américas, no leste do Mediterrâneo, no Sudeste da Ásia e no oeste do Pacífico, ameaçando mais de 2,5 bilhões de pessoas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que pode haver 50 a 100 milhões de casos de infecções por *Dengue virus* (DENV) ao ano. Como as manifestações clínicas da dengue são, frequentemente, indiferenciadas, o diagnóstico laboratorial é importante na identificação de infecções por DENV. O método baseado na identificação de anticorpos específicos surgiu como um meio prático e confiável de diagnosticar a febre da dengue. A resposta de anticorpos contra a glicoproteína do envelope (E) viral é conhecida por desempenhar um papel na imunidade protetora e intensificação da doença, especialmente após a infecção primária. O objetivo deste trabalho foi produzir proteínas recombinantes do envelope dos quatro sorotipos de DENV no sistema *Escherichia coli* e utilizá-las no desenvolvimento de um teste imunoenzimático, IgG-ELISA, para detecção de anticorpos anti-DENV. Para testar o ELISA desenvolvido, foi feita a detecção de anticorpos anti-E dos quatro sorotipos de DENV em amostras de soro cujo perfil na soroneutralização, padrão ouro no diagnóstico sorológico da dengue era conhecido. Os resultados do teste de soroneutralização de 704 amostras de soro coletadas de moradores de Belo Horizonte (MG) foram comparados aos resultados obtidos no IgG-ELISA com as mesmas amostras apresentando 91% de sensibilidade e 98% de especificidade. Estes dados revelam que o IgG-ELISA baseado em proteínas E recombinantes mostrou-se como um ensaio bastante eficiente para a detecção de IgG anti-DENV e uma ferramenta útil nos estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: Diagnóstico sorológico, Ensaio imunoenzimático, antígenos recombinantes.

2. ABSTRACT

Dengue is the most prevalent arbovirus of the world mainly in tropical regions. The disease is endemic in more than 100 countries in Africa, the Americas, the eastern Mediterranean, Southeast Asia and the Western Pacific, threatening more than 2.5 billion people. The World Health Organization estimates that there may be 50 million to 100 million cases of *Dengue virus* (DENV) infections worldwide every year. As the clinical manifestations are frequently undifferentiated febrile illness, laboratory diagnosis is essential for confirmation of DENV infections. The method based on specific antibody identification is an easy and reliable tool for dengue fever diagnosis. Antibody response against virus envelop glycoprotein (E) is known to play a role in protective immunity and infection enhancement, especially after a primary infection. The objective of this study is to produce the four recombinant DENV serotypes envelop glycoprotein in *Escherichia coli* system and use them for the development of IgG-ELISA. To evaluate the IgG-ELISA, a panel of serum samples already tested by plaque reduction neutralization test (PRNT), gold standard serological assay for dengue infection, was investigated for the presence of antibodies anti-E against the four DENV serotypes. The results of PRNT and IgG-ELISA from 704 serum samples collected from citizens of Belo Horizonte (MG) were compared and 91% of sensibility and 98% of specificity were observed. These data show that the IgG-ELISA based on recombinant E protein has proved to be a very efficient assay for anti-DENV IgG detection and a useful tool in epidemiologic studies.

Key words: Serological diagnosis, immunoenzymatic assay, recombinant antigens.