

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PRODUÇÃO DE ESTOQUES VIRAIS CENTRIFUGADOS E
ULTRACENTRIFUGADOS DO DENV-2 PARA COMPARAÇÃO DOS TÍTULOS
VIRAIS

MANAUS- AM
2019

MAURICIO SILVA DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE ESTOQUES VIRAIS CENTRIFUGADOS E
ULTRACENTRIFUGADOS DO DENV-2 PARA COMPARAÇÃO DOS TÍTULOS
VIRAIS

Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

Orientador (a): Dra. Rosilene Gomes da Silva Ferreira

Coorientador (a): Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior

MANAUS – AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

D278m De Oliveira, Mauricio Silva
sop Produção de estoques virais centrifugados e ultracentrifugados do DENV-2 para comparação dos títulos virais / Mauricio Silva De Oliveira. Manaus : [s.n], 2019. 41 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.
Inclui bibliografia
Orientador: Rosilene Gomes da Silva Ferreira
Coorientador: Raimundo Sousa Lima júnior

1. Arboviroses . 2. Massa Viral. 3. Titulação Viral. I. Rosilene Gomes da Silva Ferreira (Orient.). II. Raimundo Sousa Lima júnior (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Produção de estoques virais centrifugados e ultracentrifugados do DENV-2 para comparação dos títulos virais

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463



AMAZONAS
GOVERNO DO ESTADO

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA AP1)

ALUNO: MAURÍCIO SILVA DE OLIVEIRA
TÍTULO DO TCC: PRODUÇÃO DE ESTOQUES VIRAIS CENTRIFUGADOS E ULTRACENTRIFUGADOS DO VÍRUS BENGUE PARA COMPARAÇÃO DOS TÍTULOS VIRAIS.

AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador: RAIMUNDO SOUSA LIMA JUNIOR	9,5
b) 1º avaliador(a): LEANDRO BARRETO DUTRA	9,2
c) 2º avaliador(a): CARLOS EDUARDO DE CASTRO ALVES	8,7
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	9,1

MÉDIA DA NOTA: 9,1

Manaus, 13 de NOVEMBRO de 2019

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA

Raimundo Sousa Lima Júnior
Orientador(a)

[Assinatura]
1º Avaliador(a)

Carlos Eduardo de Castro Alves
2º Avaliador(a)

Dedico o presente trabalho à minha mãe, que sempre foi guerreira, e esteve presente em todos os momentos de fragilidade, angústia e superação de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me proporcionar essa experiência inesquecível de ser universitário na área que sempre demonstrei interesse. Por sempre caminhar comigo, mesmo nos momentos de tristeza, desespero, cansaço, e fadiga acumulada. E por sempre ouvir e responder minhas orações.

À mulher que mais amo nessa vida, minha mãe. Que sempre procurou me incentivar e mesmo nos tempos mais remotos, prezou pela minha educação de qualidade. Uma mãe guerreira que, mesmo sozinha, lutou e provou que sim, é possível uma pequena/grande mulher ser mãe e pai de um ser humano como eu.

À minha avó paterna, que sempre me teve como um filho, um neto exemplar e que sempre buscou me ajudar da melhor forma possível.

Ao meu irmão caçula, que sempre se fez presente em minha vida.

Aos meus familiares, que sempre me incentivam a não desistir dos estudos e acreditam no meu potencial futuro.

Aos meus poucos amigos de faculdade por sempre estarem me aturando e construindo conhecimento a cerca de ser um bom profissional biólogo. Por jogar conversa foram nos momentos bons e puxar a orelha nos momentos errôneos.

Às minhas amigas do ensino médio, Hanna e Gabriela, por todo apoio e momentos inesquecíveis.

Aos meus amigos *Beautiful*, que sempre vou levar no coração, porque me apoiaram nos momentos difíceis e sombrios.

A minha parceira de laboratório Débora Sena que sempre colaborou de maneira significativa para o andamento do trabalho.

A minha orientadora Rosilene Gomes e ao coorientador Raimundo Júnior, que acreditaram no meu potencial e nunca desistiram de mim. Sempre me ajudaram da melhor forma possível.

Aos meus professores da Universidade do Estado do Amazonas que, de alguma forma, possibilitaram a construção do conhecimento e experiências vivenciadas. À Universidade do Estado do Amazonas por proporcionar cinco anos de muita batalha, sorrisos e enriquecimento da mentalidade profissional.

Ao INPA, à UFAM e ao Laboratório de Imunofarmacologia da UEA por contribuírem no desenvolvimento laboratorial da pesquisa e conhecimento científico.

A mim mesmo, por ser forte e não desistir dos meus sonhos.

“...Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas...”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O arbovírus Dengue representa um grande desafio para a Saúde Pública em muitos de seus aspectos. Esta pesquisa justifica-se pela importância de estabelecer um estoque de massa viral *in vitro* com células C6/36 infectadas por DENV-2 para que sejam possíveis estudos posteriores pelos grupos de pesquisas, que testam produtos naturais da Amazônia. Os objetivos foram: induzir a multiplicação do DENV-2 em linhagem celular do mosquito *Aedes albopictus*, C6/36; comparar a titulação de cada estoque viral por meio da *Plaque Forming Units* (PFU) em células VERO (células do rim de macaco-verde africano), após a centrifugação e ultracentrifugação; e diferenciar as titulações virais, centrifugadas e ultracentrifugadas. A produção das massas virais de Dengue foi realizada em células C6/36. Para a titulação viral, células VERO foram semeadas em placas de 6 poços e infectadas com DENV-2 ultracentrifugado para posterior contagem das colônias virais, por meio da técnica de PFU. Porém, o experimento não demonstrou positividade, alguns fatores podem ter influenciado: a agarose não solidificou quando adicionado o corante vermelho neutro, o próprio corante pode ter gerado influência, o processo de ultracentrifugação por meio da rotação em 45.000 g durante 90min a 4 °C pode ter danificado o estoque viral ou a falta de infecção. Portanto, foi possível realizar a indução da multiplicação de células em linhagens de mosquitos C6/36, proceder à centrifugação das células infectadas por DENV-2 e ultracentrifugação. Não foi possível analisar e comparar a titulação de cada estoque viral por meio da técnica de PFU, após a centrifugação e ultracentrifugação. Novos testes devem ser realizados a fim de comparar os estoques virais, possibilitando possíveis estudos que testem produtos naturais da Amazônia.

Palavras-chave: Arboviroses; Massa viral; Titulação viral.

ABSTRACT

Dengue arbovirus represents a major challenge for Public Health in many of its aspects. This research is justified by the importance of establishing an in vitro viral mass stock with C6/36 cells infected by DENV-2, so that further studies are possible by research groups, which test natural products from the Amazon. The objectives were: to induce the multiplication of DENV-2 in cell strain of the *aedes albopictus* mosquito, C6/36; compare the titration of each viral stock through *Plaque Forming Units* (PFU) in VERO cells (African green monkey kidney cells), after centrifugation and ultracentrifugation; and differentiate viral, centrifugated and ultracentrifugated titrations. The production of dengue viral masses was performed in C6/36 cells. For viral titration, VERO cells were seeded into plates of 6 wells and infected with ultracentrifugated DENV-2 for subsequent count of viral colonies, using the PFU technique. However, the experiment did not show positivity, some factors may have influenced: agarosis did not solidify when the neutral red dye was added, the dye itself may have generated influence, the ultracentrifugation process by rotating at 45,000 g during 90min at 4 °C may have damaged viral stock or lack of infection. Therefore, it was possible to induce the multiplication of cells in c6/36 mosquito strains, centrifuge of cells infected by DENV-2 and ultracentrifugation. It was not possible to analyze and compare the titration of each viral stock using the PFU technique, after centrifugation and ultracentrifugation. Further tests should be carried out in order to compare viral stocks, enabling possible studies that test natural products from the Amazon.

Keywords: Arboviruses; Viral mass; Viral titration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Vírus Dengue.....	15
Figura 02 - <i>Aedes aegypti</i>	16
Figura 03 - <i>Aedes albopictus</i>	16
Figura 04 - Centrífuga (A) e estufa para células de mosquito (B).....	21
Figura 05 - Estufa para células de mamíferos (VERO) (B).....	21
Figura 06 - Galões contendo nitrogênio líquido.....	22
Figura 07 - Organograma do processo de infecção.....	23
Figura 08 - Processo de infecção das células C6/36 (A) e Garrafas com as células infectadas com DENV-2 e o Mock (B).....	23
Figura 09 - Organograma do processo de ultracentrifugação.....	25
Figura 10 - Ultracentrifuga (A) e processo de filtração (B).....	25
Figura 11 - Diluição seriada.....	28
Figura 12 - Organograma do Processo de titulação viral pelo ensaio de Plaque.....	28
Figura 13 - Passagem Celular suplementada com tampão HEPES.....	31
Figura 14 - Indução do crescimento celular.....	31
Figura 15 - Infecção celular com DENV-2.....	32
Figura 16 - Efeito Citopático após a infecção viral com DENV-2.....	32
Figura 17 - Alíquotas de células C6/36 centrifugadas.....	33
Figura 18 - Estoque de células C6/36 e células VERO centrifugadas.....	34
Figura 19 - <i>Pellet</i> formado após a ultracentrifugação.....	34
Figura 20 - Estoques de massas virais centrifugadas e ultracentrifugadas.....	35
Figura 21 - Placas de 6 poços contendo agarose, meio filtrado e DENV-2.....	36
Figura 22 - Placas intactas após o teste de PFU (A) Agarose não totalmente solidificada (B).....	36
Figura 23 - Detecção de NS1.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Componentes e proporção para preparar o meio de cultura.....	27
-----------------	--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

C6/36	Células clones do mosquito <i>Aedes albopictus</i>
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus Dengue
DENV-2	Vírus Dengue sorotipo 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
LPS	Lipopolissacarídeo
N₂	Nitrogênio
PEN /STREP	Penicilina e estreptomicina
PFU	Unidade Formadora de Plaque
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VERO	Células do rim de macaco-verde africano
WHO	Organização Mundial da Saúde
WNV	Vírus do Nilo Ocidental
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3. METODOLOGIA	19
3.1 Locais para realização da pesquisa.....	19
3.2 Linhagens celulares e Estoque viral.....	19
3.3 Descongelamento e centrifugação das células C6/36 e VERO ...	19
3.4 Congelamento das células C6/36 e VERO.....	21
3.5 Produção das massas virais do Dengue.....	22
3.6 Ultracentrifugação dos sobrenadantes virais.....	23
3.7 Titulação viral por Ensaio de Plaque	26
3.7.1 Cálculo da Unidade formadora de placa por mL	29
3.8 Detecção de antígenos NS1	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO	38
REFERENCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Os arbovírus são um agrupamento de vírus que são baseados na transmissão viral por meio de um vetor artrópode para a infecção de um hospedeiro vertebrado. Os arbovírus não são uma classificação taxonômica, mas abarcam os membros das seguintes famílias: Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Reoviridae e Orthomyxoviridae, no entanto também são representados por um único vírus de material genético DNA, pertencente à família *Asfarviridae*, gênero *Asfivirus* (HERNANDEZ et al., 2014). As infecções virais dos hospedeiros vertebrados por um vetor artrópode são as arboviroses.

As arboviroses representam um grande desafio para a Saúde Pública em muitos aspectos (CHANCEY et al., 2015). A recente entrada de novos arbovírus desafia médicos, profissionais da saúde em geral e pesquisadores para a grande necessidade de investigações ativas e contínuas acerca dos sintomas, dos vetores, agentes etiológicos, além dos fatores ambientais e sociais que podem estar associados às epidemias e ao surgimento de novos casos clínicos (LIMA-CÂMARA, 2016). O enfrentamento de arboviroses emergentes exige políticas públicas e intervenções de amplo espectro, as quais envolvem vários setores, não somente a área da saúde (DONALISIO et al., 2017).

A presença de vírus Chikungunya (CHIKV), Vírus do Nilo Ocidental (WNV), Dengue vírus (DENV) e Zika vírus (ZIKV) no Brasil e em outros países das Américas expõe a população ao risco de infecção, já que todos os indivíduos são susceptíveis, e não existem vacinas disponíveis como método profilático e nem antivirais efetivos para o tratamento dessas infecções (CHANCEY et al., 2015).

O impacto das arboviroses relacionados à morbidade e à mortalidade vem se intensificando, visto que um grande número de indivíduos vem sendo acometidos com as implicações ruins dos serviços de saúde, a ausência de tratamento específico, a falta de vacinas e outras medidas efetivas de prevenção e controle (DONALISIO et al., 2017). Portanto, faz-se necessário o fortalecimento e a integração das vigilâncias entomológica e epidemiológica, com o intuito de direcionarmos métodos de controle e prevenção contra essas doenças infecciosas no país (LIMA-CAMARA, 2016).

Dentre as arboviroses, a dengue é considerada a mais comum entre os seres humanos e tornou-se um dos principais problemas de saúde pública mundial em

termos de morbidade, mortalidade e impactos econômicos. Trata-se de uma doença de caráter endêmico-epidêmica causada pela infecção pelo DENV (GUBLER, 2011).

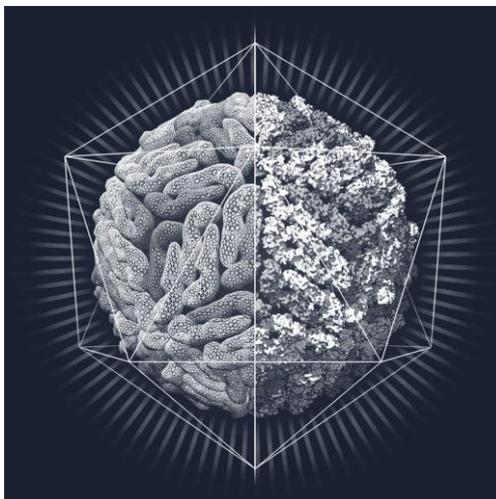


Figura 01 - Vírus Dengue

Fonte: Trading Cards Virus GIF by NeonMob - Find & Share on GIPHY.

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, apresenta quatro sorotipos diferenciados, no entanto os sorotipos estão intimamente relacionados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, sendo que a infecção por qualquer um deles pode ou não resultar nas formas graves da doença viral (WHO, 2008; 2019). Diversos genótipos foram identificados em cada sorotipo viral, o que adverte o alto grau de variabilidade genética dos sorotipos do vírus da dengue. Além disso, os genótipos dos sorotipos DENV-2 e DENV-3, conhecidos como “asiáticos”, estão frequentemente associados a casos graves da infecção secundária (WHO, 2019).

A transmissão da dengue é ocasionada principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*, no entanto, existem outras espécies pertencentes ao mesmo gênero que podem transmitir a doença como *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e várias espécies do complexo *Aedes scutellaris*, segundo a WHO (2008; 2019). O *A. aegypti* também transmite Chikungunya, febre amarela e infecção por Zika (WHO, 2008). Salienta-se que os seres humanos são infectados pela picada das fêmeas do mosquito durante o repasto sanguíneo, que, por sua vez, são infectadas principalmente por sugar o sangue de pessoas contaminadas pelo DENV (WHO, 2008 e 2019). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito *Aedes* sp. entra em contato com a corrente sanguínea do indivíduo, liberando o vírus que se alastra gerando o processo infeccioso.



Figura 02 - *Aedes aegypti*

Fonte: NBC News



Figura 03 - *Aedes albopictus*

Fonte: Moustique-tigre.info

O mosquito *Aedes aegypti* vive em habitats urbanos, domiciliares e peridomiciliares feitos pelo homem, que, ao degradar a floresta, faz com que esses artrópodes migrem para essas regiões. Ao contrário de outros mosquitos, *A. aegypti* é um alimentador diurno, logo os seus períodos de pico de picada são no início da manhã e à noite antes do anoitecer (WHO, 2008).

O estabelecimento definitivo do *Aedes* nas Américas está associado a diversos fatores: mudanças climáticas, desmatamento, urbanização desorganizada e desenfreada, formação de conglomerados de palafitas perto da vegetação, ausência de saneamento básico, somados aos deslocamentos populacionais, conforme Donalisio et al. (2017). Esses diversos fatores citados acima definem os caminhos das arboviroses, pois os arbovírus sofrem mutação viral e adaptações genéticas quanto aos hospedeiros, vetores e novos ambientes onde se encontram (DONALISIO et al., 2017).

A *Dengue* apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, muitas vezes com evolução e resultados imprevisíveis. Enquanto a maioria dos pacientes se recupera após um curso clínico não grave e de resolução espontânea, uma pequena proporção evolui para a doença na forma mais agravada, caracterizado principalmente por um aumento da permeabilidade vascular com ou sem hemorragias, e, neste último quadro, há grande risco de morte (MURPHY; WHITEHEAD, 2011; SRIKIATKHACHORN et al., 2011; WHO, 2009).

Embora a gravidade possa ocorrer em pacientes que se infectaram pela primeira vez com o vírus Dengue, a maioria dos casos de ocorrência é em doentes acometidos por uma infecção secundária (ENDY et al., 2002). Pesquisas indicam que vários elementos da resposta imune inata presentes desde o nascimento dos

indivíduos e a resposta adaptativa ou adquirida estão envolvidos na patogênese dos casos graves da Dengue (SRIKIATKHACHORN, 2009; SRIKIATKHACHORN; GREEN, 2010). Durante a infecção pelo vírus Dengue, ocorre a produção elevada de vários mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) que são envolvidos no aparecimento dos sintomas da dengue, principalmente, na regulação da função de barreira do endotélio (BOZZA et al., 2008).

Por mais que estudos venham sendo realizados com modelos murinos e primatas não humanos (ONLAMOON et al., 2010), salienta-se que ainda não existe um modelo animal fiel que simule com perfeição as características e manifestações clínicas observadas em humanos com complicações graves da Dengue.

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), a América Latina e o Caribe no ano de 2019 podem enfrentar um novo período epidêmico do dengue após dois anos de baixa incidência. Conforme a última pesquisa epidemiológica desenvolvida pela OPAS, durante os meses de janeiro e julho de 2019, mais de 2 milhões de pessoas contraíram a doença; destas 723 pessoas morreram. É importante destacar que o número de casos excede a quantidade registrada em 2017 e 2018 para os casos de dengue, embora até o momento, permaneça abaixo do que foi notificado no período de 2015 a 2016. A OPAS destaca os dez países mais atingidos pela dengue, levando em consideração a quantidade de novos casos por cada 100.000 habitantes, são eles: Nicarágua, Brasil, Honduras, Belize, Colômbia, El Salvador, Paraguai, Guatemala, México e Venezuela.

Segundo o boletim emitido pelo Ministério da Saúde (2019), o número de casos prováveis de dengue no Brasil, em janeiro de 2019, mais que dobrou em comparação ao mesmo período do ano de 2018. Registrou-se aumento de 149%, quando observado até o dia 02 de fevereiro de 2019. Os números de casos de dengue, consoante o Ministério da Saúde, passaram de 21.992 para 54.777 casos prováveis da doença no Brasil. No que se refere à incidência, em 2019, os casos chegam a 26,3 por 100 mil habitantes, um percentual alto. Em relação ao número de óbitos, até o momento, o país registrou cinco mortes: Tocantins, São Paulo, Distrito Federal com um caso cada e Goiás com dois casos de morte. Destaca-se que, em 2018, foram notificados 23 óbitos em todo Brasil. O Ministério da Saúde destaca que a Região Sudeste concentrou 60% (32.821) do total de casos de dengue registrados no país em 2019 (54.777); seguido da região Centro-Oeste,

com 10.827 casos de dengue; região Norte com 5.224 casos; Nordeste, com 4.105 casos e, por último, a região Sul com 1.800 casos.

As mortes causadas através de infecções virais como a Dengue representam uma grande preocupação para a saúde pública mundial e, apesar dos investimentos financeiros e do conhecimento científico terem crescido bastante nos últimos anos, não existe ainda um fármaco licenciado ou agente terapêutico específico para o tratamento dessa doença (SIMMONS et al., 2012). Salienta-se a inexistência de vacinas e medicamentos antivirais específicos, sendo o tratamento sintomático (PINTO JUNIOR et al., 2015). Ainda existem lacunas no entendimento desse patógeno que devem ser entendidas, e modelos *in vitro* de infecção ainda são ferramentas muito usadas para o entendimento da infecção viral desencadeada por Dengue.

Dessa forma, este trabalho justifica-se pela importância de estabelecer um estoque de massa viral *in vitro* com células C6/36 (células clone do mosquito *A. albopictus*) infectadas por DENV-2, para que sejam possíveis estudos posteriores pelos grupos de pesquisas, que testam produtos naturais da Amazônia.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar a titulação das massas virais do DENV-2 *in vitro*, após a centrifugação e ultracentrifugação.

2.2 Específicos

- Induzir a multiplicação de células em linhagens de mosquitos *Aedes albopictus*, C6/36;
- Comparar a titulação de cada estoque viral por meio de Unidade Formadora de Plaque (PFU) em células VERO, após a centrifugação e ultracentrifugação;
- Diferenciar as titulações virais, centrifugadas e ultracentrifugadas, do tipo viral na técnica utilizada.

3. METODOLOGIA

3.1 Locais para realização da pesquisa

As etapas de indução da multiplicação celular, centrifugação dos sobrenadantes e infecção pelo vírus Dengue (DENV) da linhagem celular de mosquitos *Aedes albopictus*, C6/36, foram realizadas no prédio de Microbiologia Médica, no laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

Já o processo de ultracentrifugação do sobrenadante foi realizado no laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Por fim, a indução da multiplicação das células, infecção pelo vírus Dengue da linhagem celular do rim de macaco-verde africano (VERO) e o ensaio de *Plaque* também foi realizado no laboratório de Virologia do INPA.

3.2 Linhagens celulares e estoque viral

As linhagens permanentes de células C6/36 e de células VERO foram fornecidas gentilmente pela Dr. Felipe Naveca, do Instituto Leônidas & Maria Deane da Fundação Osvaldo Cruz Amazônia (FIOCRUZ).

Para a realização dos ensaios de infecção das linhagens celulares foi utilizada uma cepa asiática padrão universal (16681) do DENV-2, que foi cedida pelo Dr. Halstead, do Centro de Pesquisas Médico Naval dos Estados Unidos da América (EUA).

As linhagens celulares de Huh-7 (hepatócitos humanos) foram fornecidas gentilmente pelo Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior, da Universidade do Estado do Amazonas (UFAM).

Os estoques de massas virais centrifugadas e ultracentrifugadas após a titulação viral pelo ensaio de *Plaque* foram depositados e armazenados no laboratório de imunofarmacologia da Escola Normal Superior (ENS)/ Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

3.3 Descongelamento e centrifugação das células C6/36 e VERO

O descongelamento das células C6/36 e VERO e dos meios DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) 500 ml, soro fetal bovino (SFB) e tripsina foram realizados em banho-maria a 36 °C. A tripsina necessita da temperatura ótima

de 37 °C, visto que é uma enzima digestiva que rompe a adesão das células do fundo da garrafa e entre as próprias células desfazendo a monocamada.

Em cada garrafa, utiliza-se 2 ml de tripsina para lavar e 2 ml para soltar as células do fundo da garrafa. Essa enzima é tóxica para a célula e sua ação sobre elas deve ser rápida, no máximo de 5 minutos na estufa na temperatura ótima de 37 °C. O SFB é utilizado para inativar a tripsina e reativar as células desativadas pela ação da tripsina. Serve também para a nutrição celular. O processo de centrifugação ocorreu de acordo com os seguintes procedimentos: as células C6/36 e VERO foram colocadas em tubos Falcon de 50 ml contendo meio DMEM suplementado com antibiótico, antifúngico e 10% de SFB. Estas células foram submetidas à centrifugação numa velocidade de rotação 185g durante 6 minutos a 4 °C.

Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos e utilizados para serem semeados em novas garrafas contendo meio DMEM suplementado com antibiótico, antifúngico e 10% de SFB. No caso das células C6/36, eram suplementadas com 100 µl de solução tampão HEPES, colaborando para manter o pH adequado.

Os Frascos (Garrafas) Cultura 50 ml – 25 cm² – K11-1050 – KASVI foram incubados em estufa a 28 °C (temperatura específica para o crescimento e proliferação das células de mosquito *Aedes*) e 37 °C, com CO₂ a 5% (condições ótimas para células VERO) para ocorrer a aderência dessas células no fundo do recipiente (formação da monocamada). No período de quatro dias, a monocamada estava completa e pronta para ser utilizada em novos procedimentos. As passagens foram realizadas duas vezes por semana através do processo de centrifugação das células e divisão em 3 novas garrafas. As centrifugações foram sendo realizadas até se obter um bom estoque de células C6/36 e VERO viáveis para serem utilizadas posteriormente.

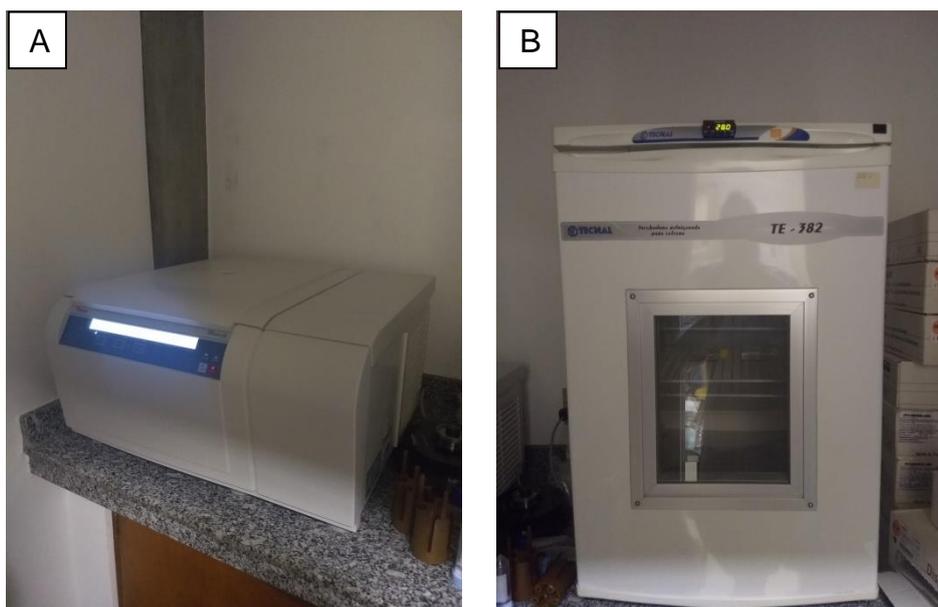


Figura 04 - Centrífuga (A) e estufa para células de mosquito (B)

Fonte: Oliveira (2018)



Figura 05 - Estufa para células de mamíferos (VERO)

Fonte: Oliveira (2018)

3.4 Congelamento das células C6/36 e VERO

No processo de congelamento das células C6/36 e VERO, deve-se adicionar 700 μ l de DMEM + 10% de SFB em 200 μ l de *pellet* contido no tubo Falcon, após o descarte do sobrenadante. Logo em seguida, colocar os 900 μ l de solução contida no tubo Falcon em um microtúbulo e adicionar 900 μ l de solução de congelamento contendo 80% de SFB e 20% de DMSO (Dimetilsulfóxido) e homogeneizar. Obtém-se, assim, um total de 1800 μ l de solução em um microtúbulo. As células submetidas ao processo de congelamento foram armazenadas à -80 °C durante 24h, para não passarem por estresse e nem sofrerem choque térmico se forem submetidas

diretamente ao nitrogênio líquido. Após 24h, as células devem ser armazenadas em nitrogênio (N₂) líquido, obtendo-se um estoque celular para futuros processos de passagem e infecção celular.



Figura 06 - Galões contendo nitrogênio líquido

Fonte: Oliveira (2018)

3.5 Produção das massas virais do Dengue

A produção das massas virais do Dengue foi realizada em células C6/36 de acordo com o método utilizado por Gandini (2014) e Mello (2015). Inicialmente, as células C6/36 do estoque produzido foram semeadas em garrafas de 150 cm² contendo meio DMEM suplementado e com 10% de SFB. Estas células foram incubadas em estufa a 28 °C durante 2 dias e depois foram infectadas com DENV-2. Depois de um período de 2 horas (h) de adsorção, o sobrenadante foi trocado por meio DMEM fresco suplementado contendo 2% de SFB e as C6/36 foram novamente colocadas em estufa a 28 °C. Oito dias após a infecção, observou-se o efeito citopático das células através da microscopia eletrônica. Os sobrenadantes contendo as partículas virais de Dengue foram colhidos e centrifugados a 1000 g, durante 10 minutos a 4 °C, para ocorrer a separação (clarificação) das células mortas e *debris*. Após a infecção e centrifugação das células C6/36, obteve-se um estoque de massa viral centrifugada para posterior ultracentrifugação. A massa viral passou pelo processo de congelamento e foi armazenada à -80 °C.

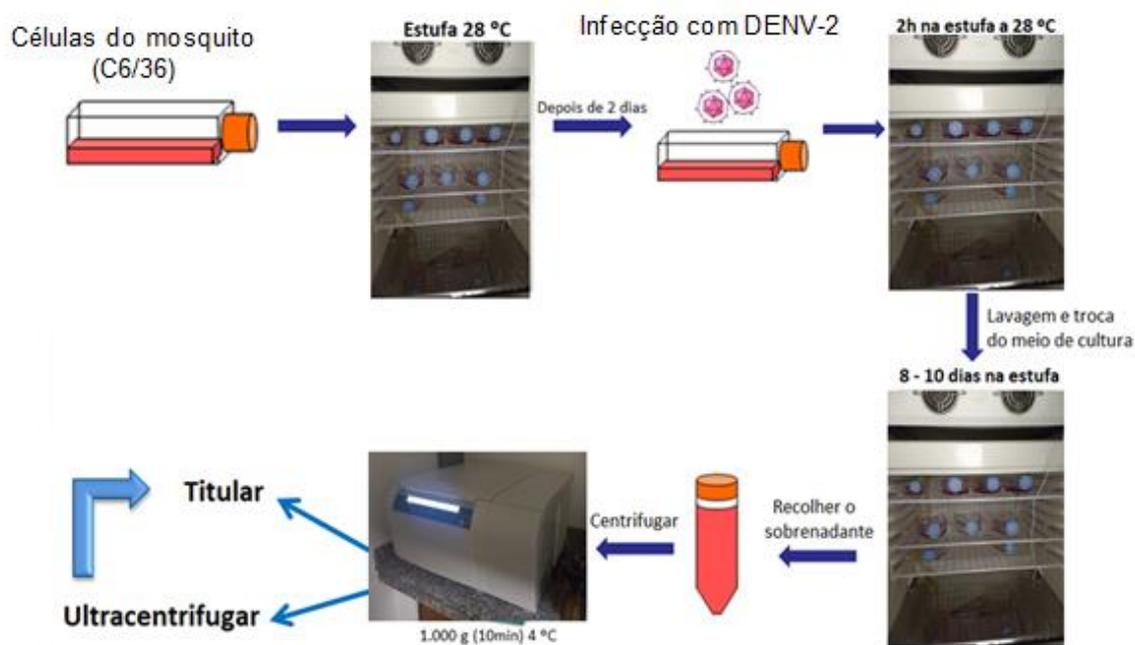


Figura 07 - Organograma do processo de infecção

Fonte: Oliveira (2019)

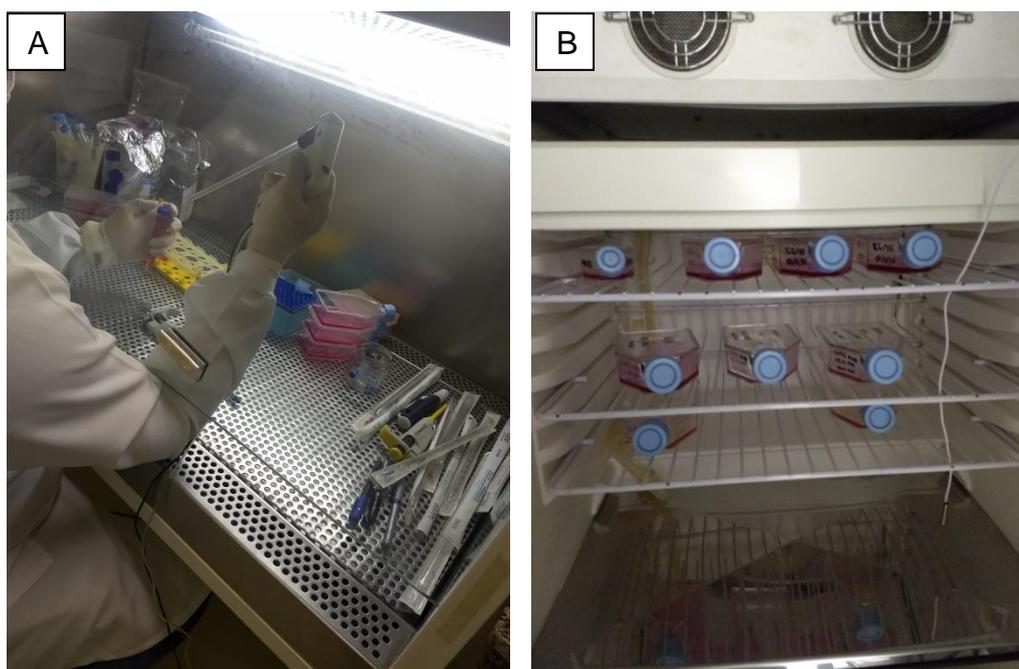


Figura 08 - Processo de infecção das células C6/36 (A) e Garrafas com as células infectadas com DENV-2 e o Mock (B)

Fonte: Oliveira (2018)

3.6 Ultracentrifugação dos sobrenadantes virais

Após as centrifugações do vírus na etapa acima, os sedimentos são descartados e os sobrenadantes submetidos à ultracentrifugação (45.000 g) durante 90 minutos a 4 °C. A ultracentrifugação ocorreu de acordo com os seguintes

procedimentos adaptados do método utilizado por Gandini (2014): primeiramente, há o descongelamento das massas virais centrifugadas de DENV-2. Logo após, as massas virais foram misturadas e homogeneizadas para obter-se 75 ml de volume final, quando se utilizou 2 tubos Falcon de 50ml e cada tubo ficou com 37,5 ml. Os controles negativos (mocks) também foram misturados e homogeneizados, obteve-se 50 ml de volume final, sendo 25 ml para cada tubo Falcon. Após a mistura e homogeneização das massas virais de DENV-2 e mocks, foram acrescentados 10% de SFB em relação ao volume presente em cada tubo. Para realizar essa conta, considere que o volume de vírus ou mock recuperado das garrafas represente 90% do volume final. Os tubos foram levados para a UFAM dentro de uma caixa de isopor contendo gelo para manter a viabilidade das suspensões virais.

Depois, as massas virais de DENV-2 e os mocks foram colocados em tubos próprios da ultracentrifuga que suportavam 50 ml. No entanto, não se utilizou o volume total dos tubos da ultracentrifuga, para ajudar no processo de sedimentação do *pellet*. Os tubos, antes de serem submetidos à ultracentrifugação, foram pesados para manter o equilíbrio entre os volumes de cada tubo. É extremamente importante tarar os tubos antes de pesar. Para isso, utilizou-se uma balança de precisão para obter pesos equivalentes com precisão de duas casas decimais. Com o auxílio de um Becker de 100 ml, os tubos foram apoiados abertos na balança e incluiu-se a tampa na pesagem. Para o procedimento de tarar, utilizou-se o próprio volume de massa viral ou mock.

As massas virais centrifugadas de DENV-2 e os Mock foram submetidos à ultracentrifugação durante 90 min a 4° C, em uma rotação de 45.000g ou 19.400 rpm. Foi realizado o acompanhamento do procedimento para se evitar possíveis erros da ultracentrifuga. O procedimento ocorreu de forma normal, sem interferências.

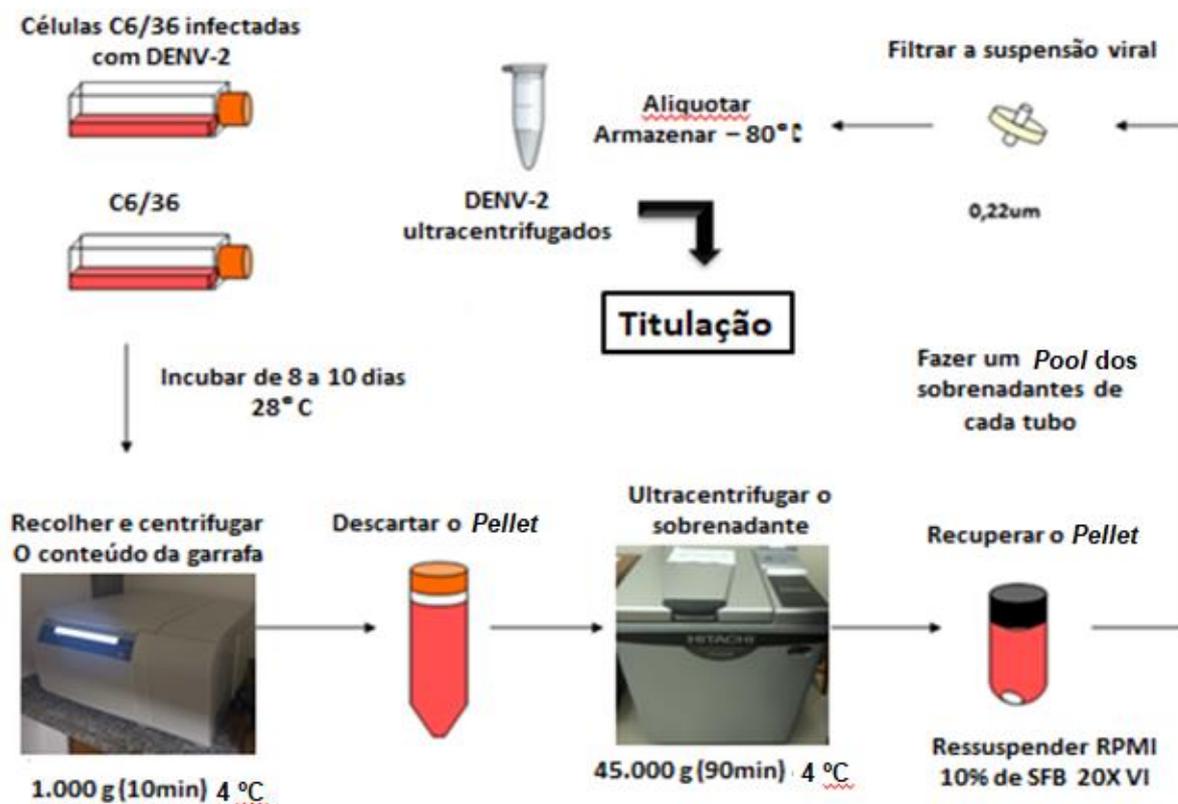


Figura 09 - Organograma do processo de ultracentrifugação

Fonte: Oliveira (2019)

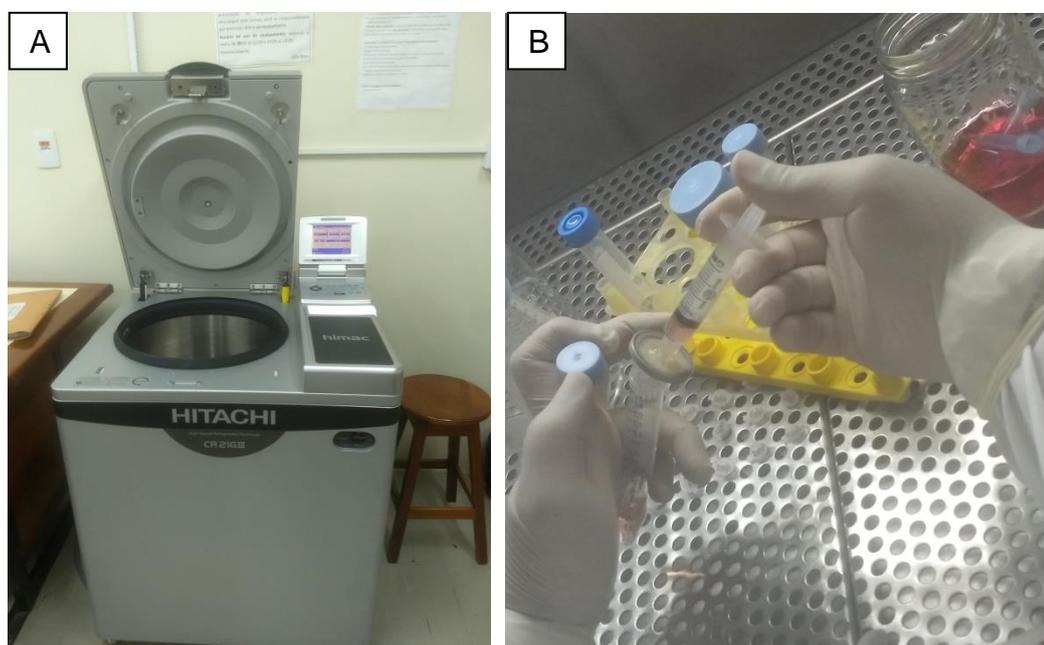


Figura 10 - Ultracentrifuga (A) e processo de filtração (B)

Fonte: Oliveira (2019)

Ao término da ultracentrifugação, obtiveram-se dois tubos com massa viral de DENV-2 ultracentrifugadas e dois Mock ultracentrifugados. Os tubos que continham as massas virais apresentaram a formação do *pellet* na parte superior do tubo, já

que a rotação não é a mesma utilizada no processo de centrifugação que forma o *pellet* no fundo do recipiente, por causa do ângulo de rotação. As massas virais e os Mock ultracentrifugados foram conduzidos com o auxílio de uma caixa de isopor contendo gelo, até o laboratório de virologia do INPA para ressuspender o *pellet* em meio de cultura e separá-los em alíquotas.

Logo após, o *pellet* foi ressuspensionado em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (esse procedimento foi feito em cada um dos tubos). Para isso, utilizou-se uma pipeta. A intenção foi reduzir o volume da massa viral em 20x o valor inicial. Logo em seguida, foi feito um pool dos volumes ultracentrifugados no próprio tubo de ultracentrifugação. Realizou-se o processo de filtração: utilizou-se uma seringa de 1 ml e filtros de 0,22 μm para filtrar o vírus. Assim, eliminaram-se bactérias e outros possíveis microrganismos. Esse procedimento, porém, não elimina Lipopolissacarídeo (LPS) ou DNA/RNA fragmentado. Nesse caso, o Mock foi considerado o controle negativo do experimento. O filtro foi pré-umidificado com RPMI 10% SFB para bloquear a membrana e evitar a perda de partículas virais. Com muito cuidado, retirou-se o êmbolo da seringa e adicionou-se o filtro na ponta da seringa e com o auxílio de uma pipeta adicionou-se o inóculo viral a ser filtrado. O êmbolo foi colocado com cuidado para não estourar o filtro. Na sequência, foi realizada a filtração, evitando a passagem de microrganismos maiores que 0,22 μm , e possibilitando a passagem do vírus DENV-2. Ao término do processo de filtração, foram feitas alíquotas de 100 μL e o estoque das massas virais ultracentrifugadas foram armazenadas no refrigerador -80 $^{\circ}\text{C}$ do bloco de microbiologia do INPA. Os estoques das massas virais ultracentrifugadas não foram submetidos posteriormente ao nitrogênio líquido.

3.7 Titulação viral por Ensaio de Plaque

Os procedimentos da titulação da massa viral por Ensaio de Plaque foram realizados conforme manual descrito pelo Laboratório de Imunologia Viral da FIOCRUZ - RJ.

As células VERO foram plaqueadas na proporção de 2×10^5 células/poço em seis placas de 6 poços (total de 36 poços, quatro para cada diluição). As diluições utilizadas foram de 10^{-9} a 10^{-1} . As células foram contadas na câmara de *Neubauer*. Utilizou-se 3 ml de meio completo, ou seja, 6×10^5 células por poço e as células

VERO foram incubadas na estufa por 48h a 37 °C e 5% de CO₂. Com 24h, observou-se se houve o crescimento da monocamada, entretanto, ela não estava com mais de 80% de confluência, a região da borda do poço não estava com a monocamada bem fechada. As células foram submetidas por mais 24h até se obter a formação completa da monocamada, pois é importante ter uma monocamada homogênea para a realização do procedimento. Depois de 48h, obteve-se a monocamada e prosseguiram-se os procedimentos.

Realizou-se a diluição da agarose 1% (1g de agarose em 100 ml de água destilada). A agarose foi colocada em um frasco de vidro de 800 ml para evitar que, ao aquecer a agarose, o volume transbordasse ao mexer. Após o preparo, o vidro contendo a agarose foi colocado em banho-maria a 42°C, com todo o seu volume abaixo da lâmina da água para evitar a solidificação da agarose. Logo depois, preparou-se a quantidade de meio necessário para o primeiro *overlay* e para a diluição seguindo a tabela 1.

Tabela 1 - Componentes e proporção para preparar o meio de cultura.

Componentes do meio de cultura	Proporção
Bicarbonato de Sódio	3mL/100mL
L-glutamina	1mL/100mL
Pen/Strep	1 mL/100mL
Fungisona	100uL/100 mL
Meio 199 10X	10mL/100mL
SFB 5%	5mL/100mL
Hepes	2,5 mL/100mL
H ₂ O	Volume necessário para completar

Fonte: Oliveira (2019)

A Identificação dos tubos eppendorf autoclavados com as diluições (10^{-9} a 10^{-1}) mais o de controle de células (cc) ocorreu logo em seguida. Posteriormente, foi realizada a diluição seriada na qual foram adicionados 100 µL do estoque do vírus no primeiro ponto (10^{-1}), misturou bem (Vortexar) e passou-se 100 µL do 10^{-1} para o 10^{-2} , foi feito esse procedimento até o último ponto da diluição e não foi necessário desprezar os 100 µL retirados do último ponto.

As placas utilizadas foram identificadas de acordo com as diluições. Posteriormente, verteu-se a placa de maior diluição (10^{-9}) para retirada do meio e

adicionou-se 100 μ L da diluição em cada poço pela parede da placa. O mesmo procedimento seguiu-se até a última diluição. As placas foram incubadas por 1h na estufa 37 °C com 5% CO₂ (estufa “suja”) e a cada 15 min, movimentada para frente e para trás (fazendo uma cruz) e de um lado para o outro. Após a incubação, adicionou-se 3mL de meio homogeneizado com agarose em cada poço pela parede, com o auxílio de uma pipeta sorológica evitando bolhas e a solidificação da agarose. As placas foram incubadas na estufa (37°C com 5% CO₂) durante 6 dias e observou-se diariamente se houve a formação das plaque.

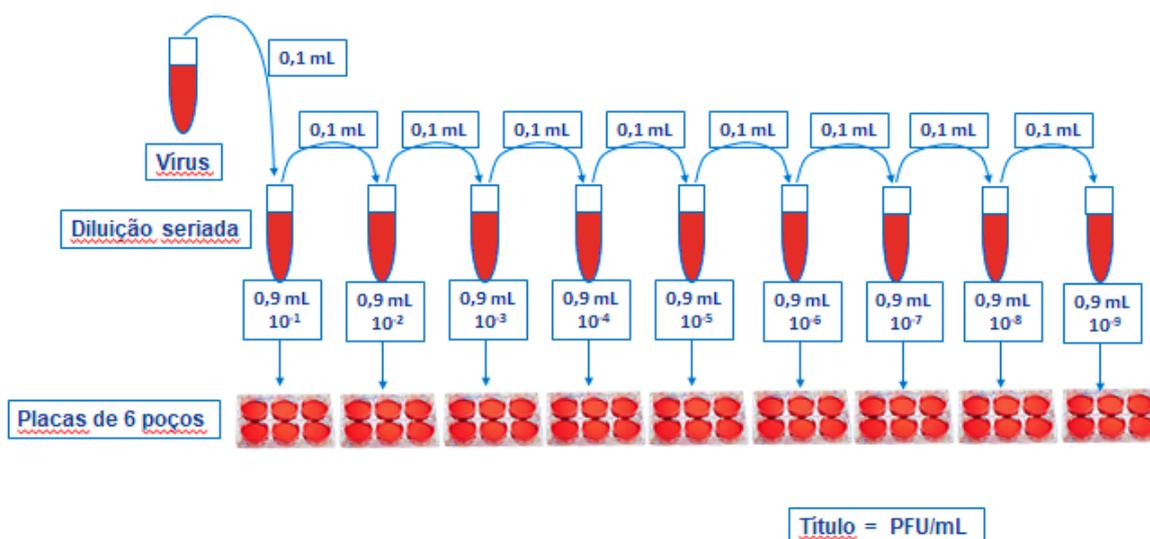


Figura 11 - Diluição seriada
Fonte: Oliveira (2019)



Figura 12 - Organograma do Processo de titulação viral pelo ensaio de Plaque
Fonte: Oliveira (2019)

Depois de cinco dias foi feito o segundo *overlay*, no dia anterior da data esperada. Foi adicionado 3 mL de meio com agarose e corante vermelho neutro em cada poço pela parede, evitando bolhas, em cima do primeiro *overlay*. Após 24h do segundo *overlay* adicionado, é possível fazer a contagem das placas brancas em cada poço e depois fazer uma média das replicatas em cada diluição.

3.7.1 Cálculo da Unidade formadora de placa por mL

Para a realização da contagem das plaques, deve-se levar em consideração que cada “placa” é originada de uma partícula viral. Todavia, o número de partículas virais inoculadas inicialmente corresponde ao número de placas observadas. Pelo fato de possuir grande quantidade de vírus, as duas primeiras diluições (10^{-1} e 10^{-2}) não são contadas, devido a total destruição da monocamada. Após a contagem, fazer a média das replicatas de cada diluição. O título viral é o produto do somatório das médias obtidas nas diluições que apresentam acima de 10 placas, multiplicado pela respectiva diluição:

Média diluição A + média diluição B = média das melhores diluições

Média das melhores diluições x 100µl (volume do vírus) = ____ PFU/mL

3.8 Detecção de antígenos NS1

Foi realizado um ensaio imunoenzimático rápido para saber a dosagem do antígeno NS1 no sobrenadante de hepatócitos humanos infectados com vírus DENV-2 ultracentrifugado. Com a finalidade de saber se a alíquota viral ultracentrifugada estava viável para infecção, hepatócitos humanos (Huh-7) foram colocados em cultura e depois infectados DENV-2 ultracentrifugado. Após 48 horas de infecção, o sobrenadante das Huh-7 infectadas foi utilizado para dosagem do antígeno viral NS1. A NS1 trata-se de uma glicoproteína que está ausente na partícula viral infecciosa, todavia, é essencial para replicação viral.

Quando ocorre a liberação de NS1 no soro ou sobrenadante, há uma correlação direta com a viremia (LIBRATY et al., 2002). Com isso, para esta dosagem da NS1 no sobrenadante das Huh-7 infectadas, foi utilizado o Kit de ELISA *Platelia* Dengue NS1 Ag (BioRad), que é um ensaio imunoenzimático rápido e confiável para a quantificação relativa de antígeno NS1 no soro de pacientes (SILVA et al., 2011) e no sobrenadante células em cultura (LUDERT et al., 2008;

CEBALLOS-OLVERA et al., 2010; LIMA-JUNIOR et al., 2013; MELLO et al., 2017). Para tanto, adicionou-se por poço da placa 50µL de Solução Diluente, 50µL de amostra diluída 1:40 ou controle, 100µL de Conjugado diluído, seguidamente. Depois, a placa foi adesiva e levada para incubação na condição de 37 °C /5%CO₂ por 90 minutos. Após este período, lavou-se a placa 6 vezes com Solução de Lavagem do kit para depois ser adicionado o substrato TMB (160µL/poço). A placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos para imediatamente depois ser acrescentada solução de paragem (H₂SO₄ 1N) com a finalidade de estancar a reação colorimétrica. Por fim, foi realizada a leitura das densidades ópticas na leitora de ELISA *Robonik* (Robonik India PVT), no comprimento de onda 540nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução da multiplicação de células C6/36 foi realizada de maneira positiva, na qual obteve-se um estoque celular que foi submetido ao processo de infecção pelo DENV-2. As células do mosquito *A. albopictus* demonstraram uma demora em se multiplicarem, isso se deve ao fato de ocorrerem mudanças no meio de cultivo. Levaram cerca de 6 a 7 dias para apresentarem a monocamada com mais de 80% de confluência.

As células, quando submetidas à multiplicação, foram suplementadas com solução tampão HEPES, meio DMEM contendo antibiótico, fungisone e 10% de SFB para facilitar na proliferação e crescimento. As células só mostraram bom crescimento e multiplicação quando o meio DMEM era suplementado com solução HEPES. A solução tampão HEPES ajudou a manter o pH sem variações bruscas, colaborando significativamente para o desenvolvimento e multiplicação celular. Na ausência da solução tampão HEPES, as células C6/36 levavam mais de 7 dias para formarem a monocamada.

Em estudos realizados por Montagner et al. (2000), que visava avaliar a amplitude da variação de pH em meios de maturação e de cultivo embrionário, com diferentes concentrações do tampão HEPES, observou-se que os meios contendo 25,0 mM de HEPES foram mais eficientes, pois minimizaram a variação do pH se comparados aos meios com 12,5mM ou sem HEPES. Portanto, a solução HEPES é recomendável para o aumento da produção de embriões *in vitro* com maior repetibilidade, durante a maturação e o cultivo embrionário.



Figura 13 - Passagem Celular suplementada com tampão HEPES
Fonte: Oliveira (2019)



Figura 14 - Indução do crescimento celular
Fonte: Oliveira (2019)

As células C6/36 disponíveis em estoque foram centrifugadas a 185g ou 1.100 rpm durante 6 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e aproveitou-se o *pellet* na qual foi suplementado com meio DMEM fresco e 10% de SFB para as células permanecessem viáveis. Foi possível realizar a infecção das células com o vírus Dengue (DENV-2), e, ao final do processo de infecção, observou-se o efeito citopático. O efeito citopático é caracterizado pela formação de aglomerados de células que se desprendem do fundo da garrafa e desfazem a monocamada.

Estudo realizado por Nunes et al. (2015) observou que isolados de CHIKV em culturas de *A. albopictus* (C6/36) de baixa passagem foram colhidas da monocamada num período de 6 a 10 dias pós infecção ou após efeito citopático

evidente, confirmando a infecção viral. Como foi possível observar, as células C6/36 são excelentes para serem infectadas por DENV-2, pois demonstraram o efeito citopático num período de 6 a 10 dias.



Figura 15 - Infecção celular com DENV-2
Fonte: Oliveira (2019)

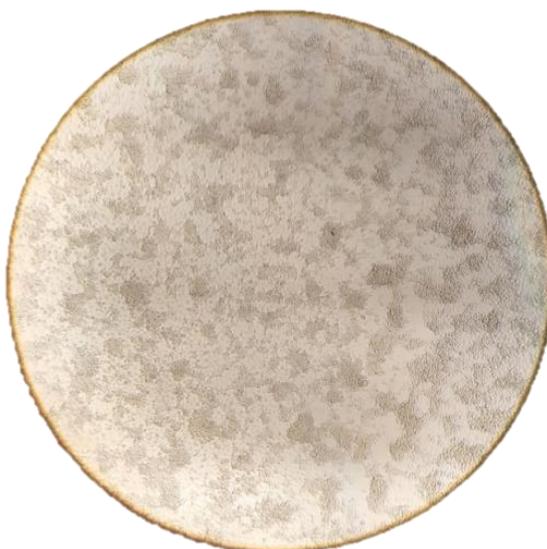


Figura 16 - Efeito Citopático após a infecção viral com DENV-2
Fonte: Oliveira (2018)

Foram feitas alíquotas contendo massa viral centrifugada, obtendo um estoque viral viável, sendo que 2/3 do total de células centrifugadas foi ultracentrifugado a 45.000 g a 4 °C, por 90 min.



Figura 17 - Alíquotas de células C6/36 centrifugadas

Fonte: Oliveira (2019)

A indução da multiplicação de células VERO foi satisfatória, pois obteve-se um estoque celular considerável de células VERO. As células VERO se desenvolvem bem quando submetidas a temperatura e condições ótimas de 37 °C a 5% de CO₂. Em 4 dias, observou-se a formação da monocamada e foram feitas mais de 10 passagens celulares, aumentando a quantidade de células do estoque. No total, foram obtidas mais de 30 alíquotas de células VERO centrifugadas. Esses estoques de células foram submetidos a -80 °C e posteriormente ao nitrogênio líquido, pois, para armazenamento em longo prazo, as células VERO devem ser mantidas em nitrogênio líquido ou a -80 °C para permanecerem viáveis (AMMERMAN et al., 2009).

Segundo manual indicado por Ammerman et al. (2009), as células VERO são linhas celulares contínuas de mamíferos mais comuns usadas na pesquisa. Esta linhagem celular dependente de ancoragem tem sido amplamente utilizada em estudos de virologia, no entanto, tem sido usada também em muitas outras aplicações, incluindo a propagação e estudo de bactérias intracelulares com *Rickettsia* spp. e parasitas com *Neospora* sp. As células VERO são utilizadas também para a avaliação dos efeitos de produtos químicos, toxinas e outras substâncias nas células de mamíferos a nível molecular, conforme Ammerman et al. (2009). A indução dessas células é primordial para a testagem de novos estudos científicos utilizando células de mamífero.



Figura 18 - Estoque de células C6/36 e células VERO centrifugadas
Fonte: Oliveira (2019)

Para Mello (2015), o processo de ultracentrifugação deve ocorrer numa velocidade de 100.000g durante 1 hora a 4 °C. No entanto, a ultracentrífuga utilizada possuía uma rotação máxima de 45.000g. O processo de ultracentrifugação ocorreu a 45.000g a 4 °C por 90min (o tempo foi acrescido para tentar compensar a velocidade de rotação), situação em que o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido 20x ao volume inicial. As alíquotas ultracentrifugadas foram armazenadas na -80 °C para preservação do estoque viral ultracentrifugado.



Figura 19 - *Pellet* formado após a ultracentrifugação
Fonte: Oliveira (2019)

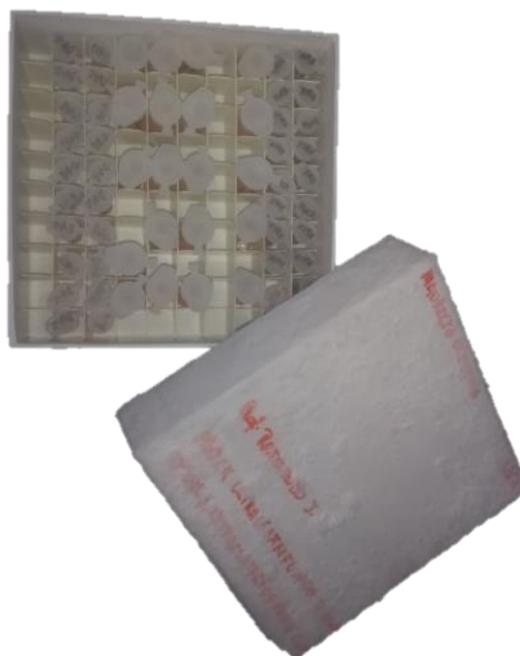


Figura 20 - Estoques de massas virais centrifugadas e ultracentrifugadas
Fonte: Oliveira (2019)

Foi possível a realização da titulação viral utilizando-se as massas virais ultracentrifugadas. Nesse procedimento, as células VERO foram semeadas em placas de 6 poços, visto que eram de fácil manipulação e possibilitaram a infecção pelo DENV-2 ultracentrifugado. As células VERO foram infectadas com DENV-2 ultracentrifugado para que posteriormente fosse realizada a contagem das colônias virais, por meio da técnica de PFU. O experimento, contudo, não demonstrou positividade; pode ter sofrido influências de fatores abióticos ou dos componentes utilizados nos procedimentos: não houve a formação de colônias virais; a malha de agarose solidificada contendo meio filtrado mostrava-se intacta e sem sinais de presença viral (formação de Plaque); após a adição do corante vermelho neutro, a agarose não se manteve solidificada, e, mesmo sendo submetida novamente à estufa, não houve a formação de placas.



Figura 21 - Placas de 6 poços contendo agarose, meio filtrado e DENV-2
Fonte: Oliveira (2019)

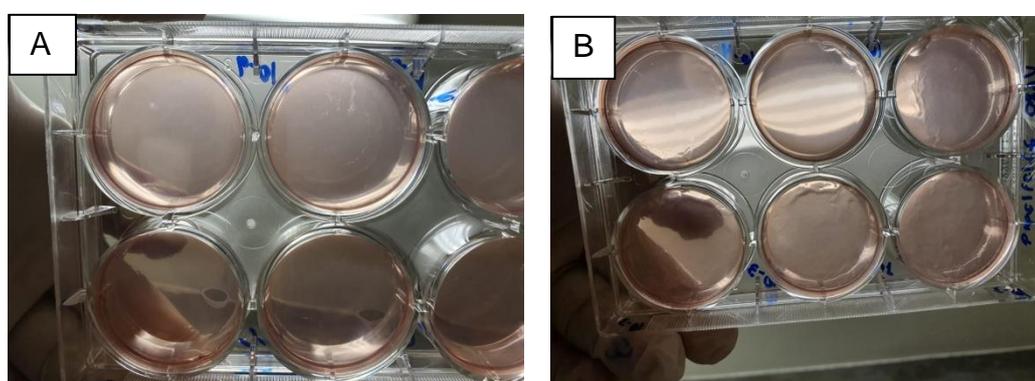


Figura 22 - Placas intactas após o teste de PFU (A) Agarose não totalmente solidificada (B)
Fonte: Oliveira (2019)

Não houve o processo de infecção viral de maneira positiva, pois o teste de dosagem da proteína NS1 não indicou a infecção viral. Os controles positivos e negativos ficaram bem próximos, sendo que o controle 1 (positivo) possuía infecção com DENV-2 e o controle 2 (negativo) não possuía. Deveria haver uma diferença entre os controles positivo e negativo após o término do teste de dosagem da NS1. As concentrações de NS1 (DO) foram inferiores a 0.048 o que indica a falta de infecção viral no teste realizado.

Em estudos realizados por Mello (2015), as massas virais infectadas com DENV-2 demonstraram positividade, pois exibiram a presença da infecção. A detecção viral foi confirmada após teste antiviral utilizando extratos de *Uncaria* sp. através da presença da proteína NS1 (proteína não estrutural presente no DENV relacionada com a lise de células infectadas, mediada pelo sistema complemento). Segundo Mello (2015), a presença de NS1 indica a infecção viral. A ausência indica que não houve infecção.

Em estudos realizados por Lima Júnior (2013), para determinar o perfil cinético da infecção de células endoteliais realizada pela dosagem do antígeno viral NS1, observou-se que o procedimento foi promissor, pois as células HMEC-1 e Huh-7 apresentaram a infecção por DENV-2. Lima Júnior (2013) destacou que a dosagem do antígeno NS1 revelou que a infecção das HMEC-1 foi menor somente nas primeiras 24h após a infecção, e permaneceu constante entre 48h e 72h. Foi possível observar a dosagem de NS1 nos sobrenadantes das células Huh-7 infectadas, e, a partir disso, observou-se uma infecção crescente para Huh-7 durante os 3 dias da cinética saindo de 0.7 a 2.4 NS1 (DO). O controle negativo manteve-se inalterado confirmando a falta de infecção viral.

Na figura 23, observe que tanto a cultura infectada com DENV-2 quanto o controle não infectado demonstraram praticamente o mesmo valor de NS1. Indicando a falta de infecção viral. O que não foi perceptível nos estudos de Mello (2015), na qual a detecção de NS1 nos sobrenadantes da cultura infectada com DENV-2 foi de forma progressiva ao longo do tempo de incubação. No entanto, a NS1 foi ausente nos sobrenadantes de células controle e células expostas ao vírus inativo.

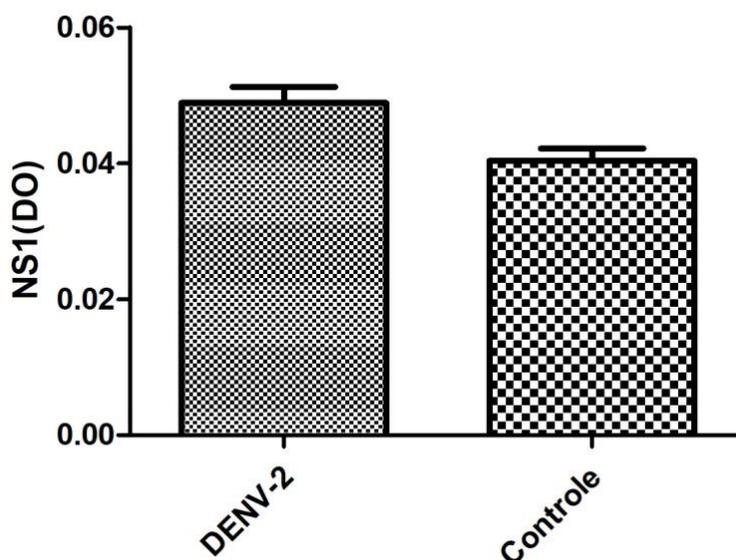


Figura 23 - Detecção de NS1
Fonte: Raposo et al. (2019)

Destaca-se que alguns fatores, exceto a presença viral, podem ter influenciado a falta das colônias virais: a agarose que estava vencida não solidificou

quando se adicionou o corante vermelho neutro; o próprio corante pode ter gerado influência ou o processo de ultracentrifugação por meio da rotação em 45.000 g durante 90min a 4 °C pode ter danificado o estoque viral, já que adicionou-se 30 minutos ao período de rotação.

A titulação viral por meio da técnica de PFU deve ser realizada utilizando-se células (VERO) infectadas com massas virais centrifugadas, com o intuito de observar se haverá a formação de placas. Já que só foi possível realizar a PFU com células ultracentrifugadas disponíveis em estoque. As células centrifugadas e infectadas com DENV-2 também devem ser utilizadas para analisar se houve ou não infecção viral, através de teste imunoenzimático para avaliar a presença da glicoproteína NS1.

Muitas foram as dificuldades encontradas no decorrer da pesquisa. A falta de um laboratório apropriado, a falta de equipamentos próprios evitando o deslocamento com o experimento em andamento, a falta de materiais na data de validade, a falta de alguns meios de culturas e correntes adequados, a falta de investimento financeiro por agências de fomento, dentre outras limitações. No entanto, as análises da titulação das massas virais centrifugadas e ultracentrifugadas são essenciais para se analisar o grau de virulência do DENV-2, possibilitando futuros estudos que possam testar bioativos e produtos naturais da Amazônia contra o DENV-2.

5. CONCLUSÃO

Portanto, foi possível realizar a indução da multiplicação de células em linhagens de mosquitos C6/36, proceder à centrifugação das células infectadas por DENV-2 e ultracentrifugação. Foi possível induzir a multiplicação de células VERO e infecção com DENV-2 para submeter ao processo de titulação viral por meio da PFU. Não foi possível analisar e comparar a titulação de cada estoque viral por meio da técnica da PFU, após a centrifugação e ultracentrifugação.

Os estoques de massas virais centrifugadas e ultracentrifugadas de células C6/36 infectadas pelo DENV-2 podem ser utilizados para a realização de novos estudos que testem produtos naturais da Amazônia contra o DENV. Buscando, assim, um possível fármaco eficiente ao combate da Dengue e amenizando os impactos negativos acarretados pela infecção viral.

REFERÊNCIAS

- AMMERMAN, N. C.; BEIER-SEXTON, M.; AZAD, A. F. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. **Curr Protoc Microbiol**, 2009.
- BOZZA, F. A.; CRUZ, O. G.; ZAGNE, S. M.; AZEREDO, E. L., NOGUEIRA, R. M.; ASSIS, E. F.; BOZZA, P. T., KUBELKA, C. F. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC infectious diseases**, 2008.
- CEBALLOS-OLVERA, I.; CHAVEZ-SALINAS, S.; MEDINA, F.; LUDERT, J. E.; DEL ANGEL, R. M.; JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. **Virology**. n. 396, vol. 1, p. 30-36, 2010.
- CHANCEY, C.; GRINEV, A.; VOLKOVA, E.; RIOS, M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. **Biomed Res Int**, 2015.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Rev Saúde Pública**, 2017 .
- ENDY, T. P.; CHUNSUTTIWAT, S.; NISALAK, A.; LIBRATY, D. H.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L.; VAUGHN, D. W.; ENNIS, F. A. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American journal of epidemiology**, n. 156, p. 40-51, 2002.
- GANDINI, M. **Dengue e imunologia inata: estudo dos fatores antivirais e citotóxicos em células dendríticas plasmacitoides e células NK durante a infecção pelo vírus dengue**. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. **Trop Med Health**, n. 39, p. 3-11, 2011.
- HERNANDEZ, R.; BROWN, D. T.; PAREDES, A. Structural differences observed in arboviruses of the alphavirus and flavivirus genera. **Advances in virology**, 2014 .
- LIBRATY, D. H.; YOUNG, P. R.; PICKERING, D.; ENDY, T. P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **The Journal of infectious diseases**, n. 186, vol. 8, p. 1165-1168, 2002.
- LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev Saude Publica**, p. 36-50, 2016.
- LIMA-JÚNIOR, R. S. **Efeito Antiviral, Imunomodulador e Atenuante da permeabilidade endotelial de uma fração alcaloide de *uncaria tomentosa* em**

células infectadas pelo DENV-2. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2013.

LIMA-JÚNIOR, R. S.; MELLO, C.S.; SIANI, A.C.; VALENTE, L.M.M.; KUBELKA, C.F. *Uncaria tomentosa* alkaloidal fraction reduces paracellular permeability, IL-8 and NS1 production on human microvascular endothelial cells infected with dengue vírus. **Natural Product Communications**, n. 8, p. 1547-1550. 2013.

LUDERT, J. E; MOSSO, C.; CEBALLOS-OLVERA, I.; DEL ANGEL, R. M.; Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. **Virology journal**, n. 5, p. 51, 2008.

MELLO, C. S. **Atividade antiviral e imunomoduladora de extratos originados de *uncaria sp.* Em infecção in vitro de linhagem contínua de hepatócitos humanos pelo vírus Dengue.** Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Fevereiro de 2015.

MELLO, C. S.; VALENTE, L. M. M.; WOLFF, T.; LIMA-JUNIOR, R. S.; FIALHO, L. G.; MARINHO, C. F.; AZEREDO, E. L.; OLIVEIRA-PINTO, L. M.; PEREIRA, R. C. A.; SIANI, A. C.; KUBELKA, C. F. Decrease in Dengue virus-2 infection and reduction of cytokine/chemokine production by *Uncaria guianensis* in human hepatocyte cell line Huh-7. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 112, vol. 6, p. 458-468, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Ministério da Saúde** alerta para aumento de 149% dos casos de dengue no país. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45257-ministerio-da-saude-alerta-para-aumento-de-149-dos-casos-de-dengue-no-pais> Acesso em: 26 nov. 2019.

MONTAGNER, M. M.; GONÇALVES, P. B. D.; NEVES, J. P. ; COSTA, L. F. S.; BORTOLOTO, E. B.; FARIAS, A. M.; STRANIERI, P.. Hepes na produção de embriões bovinos *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 469-474, 2000.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual review of immunology**, n. 29, p. 587-619, 2011.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BioMed Central – BMC Medicine** n. 13, p. 102, 2015.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE - OPAS, **OPAS** faz alerta sobre complexa situação da dengue na América Latina e no Caribe. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6008:opas-faz-alerta-sobre-complexa-situacao-da-dengue-na-america-latina-e-no-caribe&Itemid=812 Acesso em: 26 nov. 2019.

ONLAMOON, N.; NOISAKRAN, S.; HSIAO, H. M.; DUNCAN, A.; VILLINGER, F.; ANSARI, A. A.; PERNG, G. C. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. **Blood**, n. 115, p. 1823-1834, 2010.

PINTO JUNIOR, V. L.; LUZ, K.; PARREIRA, R. e FERRINHO, P. Vírus Zika: Revisão para Clínicos. **Acta Médica Portuguesa**, a Revista Científica da Ordem dos Médicos. vol. 28, n. 6, 2015.

SILVA, F. G.; SILVA, S.J.S; ROCCO I. M.; SILVEIRA V.R; SUZUKI A, KATZ G, et al. Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue – São Paulo. **Bepa**. Vol. 8, n. 91, p. 14-26, 2011.

SIMMONS, C. P.; FARRAR, J. J.; NGUYEN, V.; WILLS, B. Dengue. **The New England journal of medicine**, n. 366, p. 1423-1432, 2012.

SRIKIATKHACHORN, A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. **Thrombosis and haemostasis**, p. 102, 1042-1049, 2009.

SRIKIATKHACHORN, A.; GREEN, S. Markers of dengue disease severity. **Current topics in microbiology and immunology**, n. 338, p. 67-82, 2010.

SRIKIATKHACHORN, A.; ROTHMAN, A. L.; GIBBONS, R. V.; SITTISOMBUT, N.; MALASIT, P.; ENNIS, F. A.; NIMMANNITYA, S.; KALAYANAROOJ, S. Dengue-how best to classify it. **Clinical infectious diseases**, n. 53, p. 563-567, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition. **World Health Organization**, Geneva, p.147, 2009.

_____. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Factsheet No 117, revised May. Geneva, **World Health Organization**, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acesso em: 12 mar. 2019.

_____. Fight against dengue: The Mosquito. New edition. **World Health Organization**, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/denguecontrol/mosquito/es/>> Acesso em: 12 mar. 2019.